

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Untersuchungen zur Isolierung, Charakterisierung
und Identifizierung zweier estradiolstimulierbarer
Transkripte aus C6 Glioma-Zellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

HANS PETER NALIK

Bochum 1988

Die vorliegende Arbeit entstand am
Lehrstuhl für Biochemie der Fakultät für Chemie an
der Ruhr-Universität Bochum.

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 1988

Vorsitzender: Prof. Dr. W. R. Roth

- 1. Prüfer : Prof. Dr. O. Pongs
- 2. Prüfer : Prof. Dr. B.-J. Benecke
- 3. Prüfer : Prof. Dr. G. M. Schneider

Herrn Prof. Dr. O. Pongs danke ich für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und hilfreiche Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. M. Panayotova-Heiermann für Ihre profunde Vorarbeit, die die Grundlage meiner Arbeit bildete. Mein Dank gilt auch Herrn Dipl.-Chem. H. Werr für die HeLa-poly(A⁺)-RNA und für seine Unterstützung bei der cDNA-Synthese sowie Herrn K. Grabert für die Durchführung der photographischen Arbeiten.

Frau Dipl.-Biol. U. Dorzok (Abtlg. für Med. Mikrobiologie u. Immunologie der RUB) und Herrn Dr. P. Bellemann (Bayer Pharma-Forschung) danke ich für die Beschaffung der Ratten und für Ihre Hilfe bei der Gewebeentnahme.

Ganz herzlich möchte ich meinem Bruder Ulrich danken, der einen großen Teil des Manuskriptes getippt hat.

Schließlich bedanke ich mich bei Frau Dipl.-Chem. P. Hirschberg, Frau Dipl.-Chem. I. Ganse, Herrn Dr. U. Kanngießner und Herrn Dipl.-Chem. D. Voß für Ihre konstruktive Kritik an dieser Arbeit.

	Seite
1. Einleitung	1
2. Experimenteller Teil	4
2. 1. Verwendete Bakterienstämme	4
2. 2. <u>In vitro</u> Verpackung von λ -DNA	5
2. 2. 1. Herstellung der Verpackungslysate	5
2. 2. 2. Bestimmung der Verpackungseffizienz	6
2. 3. Konstruktion einer cDNA-Bibliothek in λ gt10	7
2. 3. 1. Isolierung von polyadenylierter RNA aus der C6 Glioma-Zelllinie	7
2. 3. 2. Synthese einzelsträngiger cDNA	7
2. 3. 3. Synthese doppelsträngiger cDNA	8
2. 3. 4. Methylierung der ds cDNA und Erzeugen von stumpfen Enden	9
2. 3. 5. Phosphorylierung der Linker-DNA	9
2. 3. 6. Verknüpfung der EcoRI-Linker mit der ds-cDNA	10
2. 3. 7. Zurückschneiden der EcoRI-Linker	10
2. 3. 8. Größenfraktionierung der ds cDNA und Abtrennung überschüssiger Linker	10
2. 3. 9. Herstellung dephosphorylierter λ gt10-Arme	11
2. 3. 10. Verknüpfung der cDNA mit der Vektor-DNA	12
2. 3. 11. <u>In vitro</u> Verpackung, Amplifikation und Lagerung der cDNA-Bibliothek	12
2. 4. Isolierung spezifischer Klone aus der cDNA-Bibliothek	13
2. 4. 1. Ausplattieren der cDNA-Bibliothek und Herstellung von Filterabzügen	13
2. 4. 2. Plaquehybridisierung und Lokalisierung positiver Klone	13
2. 4. 3. Herkunft und Beschreibung der Klone pE1 und pE2	13
2. 5. Präparation von λ -Phagen-DNA	14
2. 5. 1. Isolierung von λ gt10-DNA aus großen Lysaten zur Vektorpräparation	14
2. 5. 2. Isolierung von λ gt10-DNA aus kleinen Lysaten	14
2. 6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	14
2. 6. 1. "Freeze-Squeeze"-Methode	15
2. 6. 2. Extraktion mittels Cetyltrimethylammoniumbromid	15
2. 6. 3. Extraktion mit "Glasmilch"	15
2. 7. Isolierung von Plasmid-DNA	15
2. 7. 1. Präparative Plasmidisolierung	15
2. 7. 2. Analytische Plasmidisolierung	15
2. 8. Radioaktive Markierung von DNA	16
2. 8. 1. Endmarkierungen	16
2. 8. 2. "Nick-Translation"	16
2. 8. 3. Markierung von DNA mit Hilfe von Hexanukleotid-Primern	17

2. 9.	Subklonierungen in verschiedene Vektoren	17
2. 9. 1.	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation	17
2. 9. 2.	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	18
2. 9. 3.	Ligationen	18
2. 10.	Klonieren in M13-Phagen	18
2. 10. 1.	Präparation doppelsträngiger M13-DNA	18
2. 10. 2.	Präparation einzelsträngiger M13-DNA	18
2. 10. 3.	Bestimmung der Orientierung einklonierter Fragmente	19
2. 11.	DNA-Sequenzierungen nach dem Kettenabbruchverfahren	19
2. 11. 1.	Sequenzierungen mit modifizierter T7 DNA-Polymerase	20
2. 12.	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	20
2. 12. 1.	Auftrennung von RNA in Methylquecksilberhydroxid- und Formaldehydgelen	20
2. 12. 2.	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	21
2. 12. 3.	Elektrophorese von DNA in Polyacrylamid-Gelen	21
2. 13.	Autoradiographie	21
2. 14.	Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	22
2. 15.	Hybridisierungen	22
2. 15. 1.	Hybridisierung an immobilisierte DNA	22
2. 15. 2.	Hybridisierung an immobilisierte RNA	23
2. 16.	Isolierung von RNA aus verschiedenen Rattengeweben	23
2. 16. 1.	Gewebeaufschluß und Extraktion der Gesamt-RNA	23
2. 16. 2.	Isolierung polyadenylierter RNA	24
2. 17.	Sonstige Methoden	24
2. 17. 1.	Restriktion von DNA	24
2. 17. 2.	TCA-Präzipitation von Nukleinsäuren	25
2. 17. 3.	Auswertung der Sequenzdaten	25
3.	Ergebnisse	26
3. 1.	Herstellung der cDNA-Bibliothek	26
3. 1. 1.	RNA-Isolierung aus der Ratten-C6 Glioma-Zelllinie	26
3. 1. 2.	Optimierung der Aktivität der M-MLV Reversen Transkriptase	26
3. 1. 3.	Synthese des ersten und zweiten cDNA-Stranges	29
3. 1. 4.	Modifizierung der ds cDNA für die Klonierung	33
3. 1. 5.	Abtrennen überschüssiger Linker und Größenfraktionierung der ds cDNA	34
3. 1. 6.	Klonierung der cDNA	37
3. 2.	Isolierung von cDNA-Klonen estradiolstimulierbarer Transkripte	38

3. 3.	Charakterisierung der E1-cDNA-Klone	42
3. 3. 1.	Restriktionsanalyse	42
3. 3. 2.	Sequenzierung der E1-Subklone	44
3. 3. 3.	Identifizierung des E1-Transkriptes	47
3. 4.	Charakterisierung der E2-cDNA-Klone	51
3. 4. 1.	Restriktionsanalyse	51
3. 4. 2.	Subklonierung der E2-cDNAs in verschiedene Vektoren	53
3. 4. 3.	Sequenzierung der E2-Subklone	54
3. 4. 4.	Analyse der E2-Nukleotidsequenz	56
3. 4. 5.	Homologiesuche in der MicroGenie-Datenbank	57
3. 5.	RNA-Isolierung aus Rattengeweben	58
3. 6.	Gewebespezifitäten und sexuelle Dimorphismen des E2-Transkriptes in Ratte	59
3. 6. 1.	Expression der E2-mRNA in verschiedenen Gehirnregionen	59
3. 6. 2.	Expression der E2-mRNA in verschiedenen somatischen Organen	61
4.	Diskussion	63
5.	Zusammenfassung	71
6.	Literaturverzeichnis	72

Abkürzungen

A ₂₆₀ , A ₂₈₀ , A ₅₇₈	Absorption bei 260nm, 280nm, 578nm
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie (1Ci=3,7x10 ¹⁰ Bq)
cpm	Zählereignisse pro Minute
Cytochrom C-Oxidase	Ferrocytochrom c-O ₂ -Oxidoreduktase E. C. 1.9.3.1.
d	Dalton
DEP	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	"copy"-DNA
dsDNA	doppelsträngige DNA
ssDNA	einzelsträngige DNA
RF DNA	replikative Form der M13-Phagen-DNA
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat(e)
ddNTP	2', 3'-Dideoxyribonukleosid-5'-Triphosphat(e)
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
ESP	Estradiolstimulierbares Protein
17 β -Estradiol	3,17 β -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
min	Minute(n)
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mt	mitochondrial
NAD ⁺	β -Nicotinamid-adenin-dinukleotid
nt	Nukleotid(e)
oligo(dT)	Oligodesoxythymidylsäure
PAA	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglycol 6000
pfu	plaquebildende Einheit
QN ⁺	Cetyltrimethylammoniumbromid
RNA	Ribonukleinsäure
poly(A ⁺)-RNA	polyadenylierte RNA
m, t, rRNA	Boten-, Transfer-, ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Testosteron	17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
UE	Untereinheit
VRC	Vanadylribonukleosid-Komplex

Herkunft der verwendeten Enzyme und Substanzen

Actinomycin D	Boehringer
Agarose	BRL
Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) EC 3.1.3.1	Boehringer
Biogel A50m	BioRad
Bluescript-DNA	Stratagene
BSA	Pharmacia
Cetyltrimethylammoniumbromid	EGA
DNA-Polymerase I aus <u>E.coli</u> EC 2.7.7.7	Pharmacia
Diethylpyrocarbonat	Sigma
Desoxyribonuklease I (aus Rinderpankreas) EC 3.1.21.1	Serva
EcoRI-Linker	Boehringer
EcoRI-Methylase EC 2.1.1.72	New England Biolabs
Klenow Fragment der DNA-Polymerase I EC 2.7.7.7	Boehringer
Lysozym EC 3.2.1.17	Fluka
M13-Sequenzierungsprimer (17bp)	Pharmacia
M-MLV Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) EC 2.7.7.49	BRL
NAD-abhängige <u>E.coli</u> -DNA-Ligase EC 6.5.1.2	Pharmacia
Nylonmembranen: Hybond N	Amersham
Nytran	Schleicher&Schüll
oligo(dT) ₁₂₋₁₈	P. L. Biochemicals Inc.
oligo(dT)-Cellulose	Pharmacia
radioaktive Substanzen	NEN
Restriktionsenzyme	Boehringer, Pharmacia, BRL
RNase H EC 3.1.26.4	BRL
RNasin	Boehringer
S-Adenosylmethionin	Sigma
T4 DNA-Ligase EC 6.5.1.1	Boehringer
T4 DNA-Polymerase EC 2.7.7.7	Boehringer
T4 Polynukleotid-Kinase EC 2.7.1.78	Pharmacia
T7 DNA-Polymerase (modifiziert)	United States Biochemical Corporation

Alle anderen Chemikalien wurden von den Firmen Serva, Baker, Roth, Merck und Riedel-deHaën bezogen.



1. Einleitung

Die entwicklungsspezifischen Vorgänge und die komplexen Stoffwechselabläufe differenzierter Organismen müssen, um ein Überleben der Spezies sicherzustellen, koordiniert werden. Das Nervensystem und das endokrine oder Hormonsystem bilden innerhalb der höher differenzierten Organismen die beiden Hauptkommunikationsnetze, die diese regulatorischen Aufgaben erfüllen. Sowohl das Nervensystem als auch das Hormonsystem benutzt chemische Botenstoffe zur Signalübertragung. Während die Neurotransmitter dem Nervensystem als Signalsubstanzen dienen, erfüllen die Hormone innerhalb des endokrinen Systems diese Aufgabe. Neben Peptidhormonen und bestimmten Aminosäurederivaten sind die Steroidhormone als Signalstoffe innerhalb des hormonellen Systems von zentraler Bedeutung. Aufgrund ihrer Wirkungsweise und ihres Vorkommens können die Steroide in drei Hauptgruppen eingeteilt werden:

1. die Nebennierensteroidhormone (Mineralo- und Glucocorticoide)
2. die gonadalen Steroidhormone (Androgene, Gestagene und Estrogene)
3. die Ecdysteroide

Während die ersten beiden Gruppen als Hormone der Vertebraten vorkommen, sind die Ecdysteroide in dieser Funktion nur in Insekten und Crustaceen bekannt.

Die Synthese aller Steroide geht vom Cholesterin aus und unterliegt der hierarchischen Steuerung durch übergeordnete Hormone des Hypothalamus und der Hypophyse [1]. Die relativ kleinen, hydrophoben Moleküle ($M=400\text{g/mol}$) werden in den Blutstrom abgegeben und zirkulieren an Carrierproteine gebunden, bis sie ihre Zielorgane erreichen. Wegen ihrer lipophilen Struktur können sie dort leicht durch die Plasmamembran der Zellen diffundieren und im Cytosol der Zielzellen reversibel an spezifische Rezeptorproteine binden. Der mit dem Steroid beladene, "aktivierte" Rezeptor vermittelt die Hormonwirkung im Zellkern [2], wo er an das Chromatin bindet, indem er mit spezifischen Erkennungssequenzen interagiert [3, 4, 9]. Diese Erkennungssequenzen werden als HREs (Hormone Responsive Elements) [3, 5, 6] oder HISS (Hormone Inducible Structures) [7] bezeichnet und bewirken eine Änderung der Genexpression durch die Modulation der Transkriptionsrate [6, 8].

Ein Prinzip der Steroidhormonwirkung besteht also darin, die Transkriptionsrate durch die Regulation der Genaktivität so zu verändern, daß die Synthese bestimmter Proteine induziert (positive Regulation) oder reprimiert wird (negative Regulation). Die Lokalisierung von Steroidhormon in aktiv transkribierten, hormonsensitiven Regionen des Genoms wurde für 20-Hydroxyecdysol, einem Ecdysteroid, das in einigen Phasen der Insektenentwicklung (zum Beispiel kurz vor der Verpuppung) bestimmte Puffs in den polytären Chromosomen von Drosophila melanogaster induziert [139, 147], direkt nachgewiesen [10, 11].

Bei der Transkriptionsregulation durch Steroidhormone muß zwischen Primär- und Sekundärantwort unterschieden werden: Der

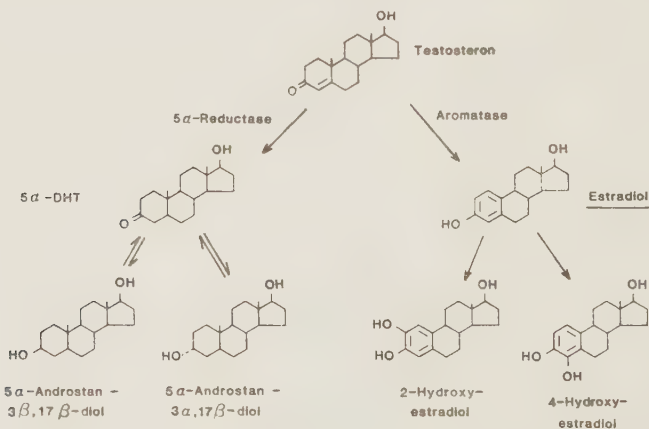
direkte Einfluß auf die Transkriptionsrate spezifischer Gene wird als primärer Hormoneffekt bezeichnet (z.B. die Induktion von Vitellogenin in der Leber von *Xenopus laevis* [12]), während ein sekundärer Hormoneffekt zeitlich verzögert durch die Genprodukte der primären Hormonantwort entsteht. Dieser Sekundäreffekt kann durch Inhibitoren der Proteinbiosynthese wie z.B. Cycloheximid unterdrückt werden, wenn er durch Proteinfaktoren vermittelt wird [13, 14].

Posttranskriptionale, sekundäre Hormoneffekte wie z.B. die Stabilisierung neusynthetisierter [15] oder schon vorhandener mRNA [14], die Reduktion vorhandener mRNA [16] wie auch Einflüsse auf die Prozessierung von Proteinen [17] zeigen die Vielschichtigkeit der Kontrollmechanismen, die durch Steroide ausgelöst werden.

Der Einfluß der gonadalen Steroidhormone auf die Expression spezifischer Gene in ihren peripheren Zielorganen wie Leber, Uterus, Ovidukt und Prostata ist vielfach untersucht und beschrieben worden [18].

Allerdings beschränkt sich die Wirkung der Sexualhormone nicht allein auf die zelluläre Entwicklung und die funktionelle Differenzierung ihrer peripheren Erfolgsorgane, sondern erstreckt sich auch auf das Zentralnervensystem [19-22].

Im Gehirn vieler Säuger spielen Testosteron bzw. sein Metabolit Estradiol eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung des "psychischen Geschlechts" während der perinatalen Phase [20]. Die sexuelle Differenzierung des Gehirns ist bei Säugetieren nämlich ein Ergebnis der unterschiedlichen Androgensekretion während ihrer frühen Lebensphase. In adulten Nagern führt dies letztlich zu unterschiedlichen Verhaltensmustern (z.B. dem Lordosisverhalten weiblicher Nagetiere) und zu einer unterschiedlichen Gonadotropinsekretion der Hypophyse bei männlichen und weiblichen Tieren [21].



Mögliche Wege der Testosteron-Metabolisierung im Gehirn.
(5α-DHT: 5α-Dihydrotestosteron)

Als das eigentlich wirksame Hormon wird bei diesen Vorgängen das 17 β -Estradiol angesehen, das im Gehirn männlicher Tiere mit Hilfe bestimmter Enzyme (Aromatase-Komplex) durch Aromatisierung von Testosteron entsteht [19, 23], so daß die durchschnittliche Konzentration an 17 β -Estradiol in adulten männlichen und weiblichen Tieren ungefähr gleich ist [24].

Die Metabolisierung von Testosteron zu 17 β -Estradiol und das generelle Vorkommen von Estradiolrezeptoren in den Gehirnen beider Geschlechter [23, 24, 25] legt die Vermutung nahe, daß 17 β -Estradiol, das gemeinhin als das weibliche Geschlechtshormon bezeichnet wird, wichtige genregulatorische Funktionen in den Gehirnen beider Geschlechter übernimmt.

Aufgrund der komplexen Anzahl von Zelltypen im Gehirn ist eine Untersuchung der Steroidhormon-Effekte auf zellulärer Ebene äußerst schwierig, so daß für solche Experimente meistens homogene Zelllinien neuronalen oder glialen Ursprungs als Modellsysteme verwendet werden.

Dennoch sind einzelne Untersuchungen, die die Wirkung der Keimdrüsenhormone auf bestimmte Zelltypen beschreiben, veröffentlicht worden: So scheinen Testosteron bzw. 17 β -Estradiol während der fötalen Lebensphase das Neuritenwachstum der sich entwickelnden Neuronen zu stimulieren [26, 27, 28].

Für einzelne neuronale und gliale Zelllinien, insbesondere auch für die in unserer Arbeitsgruppe verwendete Ratten-C6 Glioma-Zelllinie [29], sind in der Vergangenheit eine Reihe von Steroidhormoneinflüssen beschrieben worden. Bei der Mehrzahl der untersuchten Hormonwirkungen handelt es sich allerdings um Glucocorticoid-Effekte [30-35].

Aber auch 17 β -Estradiol induziert Veränderungen in der C6 Glioma-Zelllinie. So wird die Aktivität der Cerebrosid-Sulfotransferase, einem Enzym, das an der Myelinbildung beteiligt ist, stimuliert, während gleichzeitig die Cholesterinsynthese reduziert wird [36]. Ob 17 β -Estradiol die Synthese und/oder die Sekretion des NGF (Nervenzustimmungsfaktor) in der selben Zelllinie stimuliert [37], bleibt widersprüchlich, da dieses Ergebnis von einer zweiten Arbeitsgruppe nicht reproduziert werden konnte [33].

Auf molekularer Ebene wurde die Änderung der Genaktivität in Ratten-C6 Glioma-Zellen durch 17 β -Estradiol bisher lediglich von M. Vlahova untersucht [38]. In ihrer Dissertation wird die Isolierung zweier cDNAs estradiolstimulierbarer Transkripte beschrieben. Die beiden cDNA-Klone pE1 und pE2 enthalten nur sehr kurze, unvollständige cDNAs (Längen: 268bp und 473bp) aus dem 3'-nichttranslatierten Bereich der entsprechenden Transkripte E1 und E2, deren Längen mit $\approx 1,6$ kb bzw. $\approx 1,3$ kb bestimmt wurden.

Da die cDNA-Klone pE1 und pE2 aus einer cDNA-Bibliothek isoliert wurden, die eine sehr limitierte Anzahl von Rekombinanten enthielt [38], war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, durch die Herstellung einer neuen cDNA-Bibliothek im λ gt10-Phagen die Isolierung längerer bzw. vollständiger cDNAs zu ermöglichen. Desweiteren sollten die Transkripte E1 und E2 mit Hilfe ihrer cDNAs näher charakterisiert oder identifiziert werden.

2. Experimenteller Teil

2.1. Verwendete Bakterienstämme

Folgende E.coli K12-Derivate wurden benutzt:

<u>E.coli</u> -Stamm	<u>Genotyp</u>
C600 [39]	F ⁻ , supE44, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, lambda ⁻ , hsdR ⁻ , hsdM ⁺
Y1073 [40]	C600 hflA150 (Chr::Tn10)
JM101 [41]	supE, thi, del(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ['] Z delM15]
JM103 [42]	endA, del(lac, pro), thi, strA, sbcB15, hsdR4, supE, lambda ⁻ , [F', traD36, proAB, lacI ['] Z delM15]
JM109 [41]	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lambda ⁻ , del(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ['] Z delM15]
BHB2688 [43]	N205recA ⁻ [lambda imm434, cIts857, b2, red3, Eam4, Sam7]/lambda
BHB2690 [43]	N205recA ⁻ [lambda imm434, cIts857, b2, red3, Dam15, Sam7]/lambda

Die Stämme wurden als Gefrierkulturen gelagert: Gleiche Teile einer stationären Bakterienkultur und 40%igen Glycerins wurden vermischt und sofort bei -70°C eingefroren.

Bei häufigerem Gebrauch wurden die Bakterien auf LB-Agar angezoogen und bei 4°C bis zu 4 Wochen gelagert.

LB-Medium pH 7,5 [52]: 10g/l Bacto-Pepton
5g/l Hefeextrakt
10g/l techn. NaCl

LB-Agar enthielt zusätzlich 15g/l Bacto-Agar.

Die einen Fertilitätsfaktor enthaltenden Stämme wurden nur auf M9-Minimalagar gehalten. Das M9-Medium zur Herstellung der Minimalagarplatten wurde je nach Auxotrophie des entsprechenden Bakterienstammes supplementiert.

M9-Medium pH 7,5 [44, 45] : 7g/l Na₂HPO₄
3g/l KH₂PO₄
0,5g/l NaCl
1g/l NH₄Cl

Die Lösung wurde autoklaviert und nach Abkühlen auf 45°C mit den folgenden sterilen Lösungen versetzt:

20ml/l 20%ige Glucose
1ml/l 1M MgSO₄
0,1ml/l 1M CaCl₂

M9-Agarplatten enthielten zusätzlich 1,5% Bacto-Agar.

2.2. In vitro Verpackung von λ -DNA

2.2.1. Herstellung der Verpackungslysate [43, 46]

CY-Medium:	Casamino-säuren	10g/l
	Hefeextrakt	5g/l
	NaCl techn.	3g/l
	KCl	2g/l
	autoklavieren.	

Anschließend wurden folgende Lösungen
steril zugegeben (Endkonzentrationen):
+ 25mM Tris-HCl pH 7,4
+ 5mM MgSO₄

Sucrosepuffer: 50mM Tris-HCl pH 7, 5
10% w/v Sucrose

Lysozymlösung: 250mM Tris-HCl pH 7,5
2mg/ml Lysozym

Puffer M1 : 6mM Tris-HCl pH 7,5
 30mM Spermidin
 60mM Putrescin
 18mM MgCl₂
 15mM ATP
 30mM β -Mercaptoethanol

Spermidin/Putrescine wurden als Stammlösung vorher auf einen pH-Wert von 7-8 eingestellt.

Puffer A: 20mM Tris-HCl pH 8
 3mM MgCl₂
 6mM β-Mercaptoethanol
 1mM EDTA

Zur Herstellung des Verpackungsextraktes wurden die sich komplementierenden Bakterienstämme BHB 2688 und BHB 2690 (s. 2.1.) verwendet. Der Extrakt aus BHB 2690-Bakterien liefert die leeren Phagenköpfe, sogenannte "preheads". Das Lysat des Stammes BHB 2688 steuert alle übrigen für die Verpackung der λ -DNA und die Reifung der Köpfe notwendigen Proteine bei. In Gegenwart von ATP, Spermidin und Putrescin kann nackte λ -DNA mit Hilfe der Extrakte aus den obengenannten lysogenen Bakterienstämmen in infektiöse Phagenpartikel verpackt werden. Diese können dann wie in vivo erzeugte Phagen behandelt werden. Die Extrakte wurden in Anlehnung an eine von Enquist und Sternberg [46] beschriebene Methode hergestellt. Im Unterschied zu der beschriebenen Methode wurde das hier benutzte "Freeze-Thaw-Lysate" (FTL, s. u.) zusätzlich Ultraschall-behandelt, um

endogene DNA zu scheren. Diese Behandlung verhindert das Verpacken endogener DNA vollständig.

Vor der Anzucht großer Flüssigkulturen mußte das lysogene Wachstum der Stämme bei 30°C und die Induktion ihrer Prophagen bei 42°C überprüft werden. Zwei Platten eines jeden Stammes wurden ausgestrichen und parallel bei 30°C bzw. 42°C über Nacht inkubiert. Auf den bei 42°C inkubierten Platten sollte nichts wachsen. Die bei 30°C gezogenen Bakterien wurden in 5ml LB-Medium (s. 2.1.) aufgenommen und zum Animpfen von je zwei 500ml Kulturen in CY-Medium benutzt. Die Kulturen wurden bis zu einer A₅₇₈ von 0,4 angezogen und induziert. Zur Induktion wurden die Kulturen in einem 65°C warmen Wasserbad möglichst schnell auf 45°C erwärmt und bei dieser Temperatur für 15min geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien für weitere drei Stunden bei 37°C geschüttelt, bevor sie bei 6000xg, 4°C pelletiert wurden. Die Pellets aus zwei 500ml Kulturen wurden in 10ml LB-Medium resuspendiert, in Corexgläsern vereinigt und nochmals 5min bei 10000xg, 4°C abzentrifugiert.

FTL:

Das Bakterienpellet des BHB 2688-Stammes wurde zur Herstellung des FTL-Extraktes in 4ml Sucrosepuffer suspendiert, mit 50µl Lysozymlösung vermischt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach langsamem Auftauen der Suspension in Eiswasser wurde 50µl Puffer M1 zugegeben und beschallt. Es wurde ein Ultraschallgerät der Firma Branson benutzt.

Typ : Sonifier Cell Disrupter B15
Einstellung: output, 4
timer, hold
% duty cycle, 50 pulsed

Die Mikrospritze des Gerätes tauchte ca. 1cm tief in die Bakteriensuspension ein. Es wurde in 15 Intervallen von 3s mit Abkühlphasen von 27s beschallt. Der Extrakt wurde dabei ständig mit Eiswasser gekühlt, um die Temperatur unter 4°C zu halten. Die Zelltrümmer wurden im TI 75-Rotor in 60min bei 4°C, 42000xg pelletiert. Der Überstand wurde aliquotiert (50-100µl), schockgefroren und bei -70°C gelagert.

SE:

Für den "Sonic Extract" (SE) wurde das Bakterienpellet aus 1l Kultur BHB 2690 in 7ml Puffer A suspendiert und auf die gleiche Weise wie das FTL-Lysat beschallt. Die Ultraschallbehandlung wurde unter Eiswasserkühlung so lange fortgesetzt, bis die anfangs hochviskose Lösung gerade dünnflüssig wurde. Die Zelltrümmer wurden bei 16000xg, 4°C pelletiert. Der Überstand wurde aliquotiert (50µl), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.2. Bestimmung der Verpackungseffizienz

Um eine maximale Anzahl von intakten Phagen zu erhalten, mußte ein optimales Mischungsverhältnis zwischen FTL und SE (s. 2.2.1.) gefunden werden. In einem Verpackungsansatz von 25µl wurden deshalb verschiedene Volumenverhältnisse von SE und FTL zu 7µl Puffer A und 1µl Puffer M1 gegeben. Dabei wurde die zu verpackende DNA-Menge konstant gehalten. Zusätzlich wurde sowohl

FTL als auch SE gegen entsprechende ältere Lysate getestet. Für das in dieser Arbeit benutzte Verpackungslysate mußten 5µl SE und 7µl FTL eingesetzt werden. Nach einer Inkubationssequenz von 10min bei 0°C, einer Stunde bei Raumtemperatur und mindestens weiteren zwei Stunden bei 4°C wurden adäquate Phagenverdünnungen in SM-Medium zu 80µl stationärer Bakterienkultur hinzupipettiert und entsprechend 2.3.11. in 4ml Weichagarose ausplattiert.

2.3. Konstruktion einer cDNA-Bibliothek in λ gt10 [47, 48]

2.3.1. Isolierung von polyadenylierter RNA aus der C6 Glioma-Zelllinie

Die Gesamt-RNA für die Synthese der cDNA-Bibliothek wurde von M. Vlahova [38] aus der mit Estradiol behandelten C6 Glioma-Zelllinie [29] isoliert.

Die bei -20°C als Ethanolpräzipitat gelagerte Gesamt-RNA wurde mit 70%igem Ethanol salzfrei gewaschen und anschließend in DEP-behandeltem Wasser gelöst. Die polyadenylierte RNA wurde - wie unter 2.16.2. beschrieben - durch zweimalige Chromatographie an oligo(dT)-Cellulose gewonnen. Zur Konzentrierung wurde die RNA aus 0,4M LiCl gefällt und mindestens zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, um SDS quantitativ zu entfernen.

2.3.2. Synthese einzelsträngiger cDNA

Als Matrize für die cDNA-Synthese diente poly(A⁺)-RNA aus estradiolstimulierten C6-Zellen (s. 2.3.1.).

RNase-Kontaminationen wurden durch geeignete Vorbehandlung der benutzten Gefäße und Lösungen weitestgehend ausgeschlossen. Die Bedingungen zur Synthese des ersten Stranges waren in Vorversuchen (s. 3.1.2.) optimiert worden. Unter Einbeziehung der Herstellerangaben für die klonierte Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transkriptase wurde die Synthesereaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1x RT-Puffer: 50mM Tris-HCl pH 7,5
75mM KCl
10mM DTT
3mM MgCl₂

Ansatz: 1x RT-Puffer
50µg/ml poly(A⁺)-RNA
0,2µg oligo(dT)₁₂₋₁₈/µg poly(A⁺)-RNA
0,5mM dNTP
100µg/ml BSA
200U M-MLV Reverse Transkriptase pro µg
poly(A⁺)-RNA

Das Reaktionsvolumen betrug 200µl.

40µl 5x RT-Puffer, 10µl poly(A⁺)-RNA (10µg), 2µl oligo(dT)₁₂₋₁₈ (2µg) und 120µl H₂O. Die Mischung wurde für 5min auf 70°C erhitzt. Nach schnellem Abkühlen auf Eis wurden 4µl BSA (5µg/µl) und 10µl 10mM dNTP hinzugegeben. Zur Hybridisierung des oligo(dT)-Primers wurde der gesamte Ansatz 30min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 4µl α-³²P-dATP (40µCi, spezif. Akt. 800Ci/mmol) und 10µl M-MLV Reverse Transkriptase (2000U) gestartet wurde. Da die M-MLV Reverse Transkriptase sehr schnell an Aktivität verliert (Herstellerangabe), wurden nach 30minütiger Inkubation bei 37°C weitere 5µl (1000U) zugesetzt und die Synthese für 30min bei derselben Temperatur fortgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 40µl 0,2M EDTA beendet. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde jeweils 1/20 des Reaktionsvolumens (12µl) mit TCA präzipitiert (s. 2.17.2.). Die Proteine wurden durch jeweils eine Extraktion mit Phenol sowie Chloroform entfernt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit 2,5 Vol. Ethanol aus 2M Ammoniumacetat gefällt [49]. Das Präzipitat wurde mit 70%igem Ethanol salzfrei gewaschen und in 11µl H₂O gelöst. Die Länge der synthetisierten cDNA wurde auf 3%igen denaturierenden PAA-Gelen (s. 2.12.3.) kontrolliert, auf die 1µl dieser Lösung aufgetragen wurde.

2.3.3. Synthese doppelsträngiger cDNA

Die Synthese des zweiten cDNA-Stranges erfolgte analog den in der Literatur beschriebenen Verfahren [47, 49, 50]. Ein Standardansatz von 100µl enthielt:

	<u>Endkonzentrationen</u>
10µl ss-DNA/RNA-Hybrid	20 - 30µg/ml
50µl 2x Ligasepuffer	1x Ligasepuffer
1µl 4mM dNTP	40µM
0,5µl RNase H (2,5U/µl)	1,2U/µg cDNA
3µl DNA-Polymerase I (9,1U/µl)	27U/µg cDNA
1µl E. coli DNA-Ligase (0,2µg/µl)	2ng/µl
34,5µl H ₂ O	

2x Ligasepuffer: 40mM Tris-HCl pH 7,5
 10mM MgCl₂
 20mM (NH₄)₂SO₄
 200mM KCl
 0,3mM β-NAD⁺
 100µg/ml BSA

Dieser Reaktionsansatz wurde zuerst für 1 Stunde bei 12°C und anschließend 1 Stunde bei 22°C inkubiert, um optimale DNA-Reparatur- bzw. Nick-Translationsbedingungen zu schaffen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10µl 0,2M EDTA beendet. Die Proteine wurden durch eine Phenol- und zwei Chloroformextraktionen entfernt. Die wässrige Phase wurde wie in 2.3.2. beschrieben weiterbehandelt.

2.3.4. Methylierung der ds cDNA und Erzeugen von stumpfen Enden

Interne EcoRI-Erkennungssequenzen der cDNA, die beim Zurückschneiden der zum Klonieren benutzten EcoRI-Linker ebenfalls restringiert würden, sollten zuvor mit EcoRI-Methylase geschützt werden. Dazu wurde die ds cDNA in bidest. Wasser gelöst und in folgendem Ansatz in einem Volumen von 10 μ l für eine Stunde bei 37°C inkubiert:

0,2 μ g/ μ l	ds cDNA
2 U/ μ l	EcoRI-Methylase
100 mM	Tris-HCl pH 8,0
100 mM	NaCl
10 mM	EDTA
75 μ M	S-Adenosylmethionin
400 μ g/ml	BSA

Für die sich anschließende Auffüllreaktion wurde das Gesamtvolumen auf 25 μ l erhöht und die Lösung auf 10 mM MgCl₂, 20 μ M dNTP und 4 mM DTT eingestellt. Nach Zugabe von 9 U DNA-Polymerase I wurde die Reaktion bei 22°C für 10 min fortgesetzt. Um die Aktivität der Enzyme zu zerstören und die Proteine gleichzeitig zu entfernen, wurde einmal mit Phenol und zweimal mit Chloroform extrahiert. Nach Präzipitation der DNA aus 0,8 M LiCl wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in H₂O gelöst und für die Ligation mit den EcoRI-Linkern eingesetzt.

2.3.5. Phosphorylierung der Linker-DNA

Der dodekamere EcoRI-Linker besaß hydroxylierte 5'-Enden und hatte die Sequenz:

^{H³²}CCGGAATTCCGG
GGCCTTAAGGCC_{OH}

Seine Reinheit ermittelt durch HPLC-Analyse betrug laut Angabe des Herstellers über 80%. Über die Sequenzidentität gab es keine Herstellerangaben.

Um die Aktivität der T4 Polynukleotid-Kinase und später die Ligation der Linker mit der cDNA kontrollieren zu können (s. 3.1.4. Abb. 5), wurde der Phosphorylierungsreaktion γ -³²P-ATP zugesetzt. Der folgende Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert:

4 μ l	EcoRI-Linker (2 μ g)
2 μ l	10x Kinasepuffer (s. u.)
1 μ l	γ - ³² P-ATP (10 μ Ci; spez. Akt. 6000 Ci/mmol)
1 μ l	T4 Polynukleotid-Kinase (10 U)
12 μ l	H ₂ O bidest.

Nach Zugabe von 2 μ l 1 mM ATP wurde die Reaktion für weitere

4 Stunden bei 37°C fortgesetzt. Die phosphorylierten Linker konnten direkt zur Ligation eingesetzt werden.

10x Kinasepuffer: 500mM Tris-HCl pH 7,5
100mM MgCl₂
50mM DTT

2.3.6. Verknüpfung der EcoRI-Linker mit der ds cDNA

Die in H₂O gelöste cDNA (≈2µg; s. 2.3.4.) wurde in 1xLigationspuffer (s. 2.9.3.) mit einem 50fachen molaren Überschuß an phosphorylierten EcoRI-Linkern zusammengegeben. Ligiert wurde in einem Volumen von 10µl mit 2-6U T4 DNA-Ligase in Anwesenheit von 0,6 mM ATP. Die Reaktionsdauer betrug 12h bei 12°C. Durch einen abschließenden Hitzeschritt (10min/65°C) wurde das Enzym inaktiviert. Der Verlauf der Ligation wurde jeweils durch einen Parallelansatz, der statt der cDNA Wasser enthielt, kontrolliert. Die so gebildeten Linkeroligomere wurden auf 18%igen PAA-Gelen aufgetrennt (s. 3.1.4.).

2.3.7. Zurückschneiden der EcoRI-Linker

Die mit EcoRI-Linkern versehene cDNA wurde mit EcoRI-Endonuklease restringiert, um passende Enden für die Klonierung zu erhalten. Interne EcoRI-Schnittstellen der cDNA waren zuvor mit der entsprechenden Methylase modifiziert worden (s. 2.3.4.).

Der Ligationsansatz aus 2.3.6. (10µl) wurde zur Restriktion auf 20µl aufgefüllt und mit 110U EcoRI-Endonuklease für 3h bei 37°C in Hochsalzpuffer [51] geschnitten. Nach Phenol- und zweimaliger Chloroformextraktion wurde aus 2M Ammoniumacetat gefällt und einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das salzfreie DNA-Präzipitat wurde in Wasser gelöst und ein zweites Mal 1h verdaut, extrahiert und gefällt.

2.3.8. Größenfraktionierung der ds cDNA und Abtrennung überschüssiger Linker

Die Abtrennung noch vorhandener überschüssiger Linker und eine Größenfraktionierung der cDNA erfolgte in einem Schritt mittels Gelfiltration. Die Säulenmatrix bestand aus Biogel A50m (100-200 mesh size, BioRad).

Die Oberflächen des Säulenkörpers und aller Gefäße wurden vor der Benutzung mit 5%iger Dimethyldichlorsilan-Lösung behandelt. Das Bettvolumen der Säule betrug 2,3ml, wobei die Säule einen Innendurchmesser von 0,3cm und eine Länge von 32cm hatte. Auf das Ende der Säule war eine Injektionsnadel (25 Gauge) aufgesteckt, die mit einem Silikonschlauch versehen war, so daß der Fluß der Säule mit einer Schlauchklemme begrenzt werden konnte [47]. Der Fluß der Säule wurde auf 1 Tropfen/4min eingestellt. Die präzipitierte cDNA (s. 2.3.7.) wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 10µl Lauffuffer gelöst.

Laufpuffer: 100mM NaCl
10mM Tris-HCl pH 7,5
1mM EDTA

Nach Zugabe von 3µl Glycerin wurde die Probe mit Bromphenolblau angefärbt und auf die Säule aufgetragen. Es wurden Fraktionen von jeweils 3 Tropfen (≈70µl) gesammelt.

Vor der ersten Benutzung war die Säule mit endmarkierten DNA-Fragmenten standardisiert worden, so daß cDNAs mit einer Länge >500bp zur Klonierung selektiert werden konnten (s. 3.1.5.). Ausgewählte Fraktionen eines Laufes wurden zur Kontrolle der Größenfraktionierung und der vollständigen Abtrennung der Linker auf 18%igen PAA-Harnstoff-Gelen untersucht. Die zur Klonierung vereinigten Fraktionen wurden durch Lyophilisation auf 1/3 ihres Volumens reduziert und mit 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70%igem Ethanol salzfrei gewaschen und zur Ligation mit der Vektor-DNA eingesetzt.

2.3.9. Herstellung dephosphorylierter λgt10-Arme [47]

Die Dephosphorylierung der Vektor-DNA wurde in drei Schritten durchgeführt:

- I. Ligation der kohäsiven Enden der Phagen-DNA
- II. EcoRI-Restriktion der λgt10-DNA
- III. Dephosphorylierung

I. Zur Hybridisierung der kohäsiven Enden wurden 10µl λgt10-DNA (5µg) mit 1,5µl 10x Ligationspuffer (s. 2.9.3.) versetzt und eine halbe Stunde bei 42°C inkubiert. Die Probe wurde auf 37°C abgekühlt und zur kovalenten Verknüpfung der cos-Stelle mit 1µl (1U) T4 DNA-Ligase sowie 1µl 6mM ATP versetzt. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde in einem Volumen von 15µl wurde das Enzym durch 10minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

II. EcoRI-Restriktionsansatz:

- 15µl Ligationsansatz aus I.
- 2µl 10x Hochsalzpuffer (s. 2.3.7.)
- 2µl H₂O
- 1µl EcoRI (20U)

Die DNA wurde 1h bei 37°C verdaut.

III. Die Dephosphorylierung der restringierten Phagen-DNA wurde durch Zugabe von 1µl alkalischer Phosphatase (5U) zum Restriktionsansatz II. erreicht. Nach einer weiteren halbstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Enzyme durch einmalige Phenol- und zweimalige Chloroformextraktion entfernt. Die DNA wurde aus 0,4M LiCl präzipitiert und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in TE-Puffer gelöst und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

TE-Puffer: 10mM Tris-HCl pH 7,9
1mM EDTA

2.3.10. Verknüpfung der cDNA mit der Vektor-DNA

Die präzipitierte, gröbenselektierte cDNA (s. 2.3.8.) wurde in 1µl Wasser aufgenommen und mit 1µl EcoRI-geschnittener, dephosphorylierter λgt10-DNA (0,5µg) versetzt. - Die zum Klonieren benutzten λgt10-Arme wurden als dephosphorylierter EcoRI-Vektor gekauft (Promega) oder nach 2.3.9. selbst hergestellt. Die cDNA/Vektor-Ligation erfolgte in 1x Ligationspuffer (s. 2.9.3.) mit 3U T4 DNA-Ligase und in Gegenwart von 0,3mM ATP in einem Gesamtvolumen von 5µl. Die Ligationsdauer betrug 36h bei 12°C.

2.3.11. In vitro-Verpackung, Amplifikation und Lagerung der cDNA-Bibliothek

Nach der Ligation (s. 2.3.10.) wurde die rekombinante Phagen-DNA auf zwei *in vitro* Verpackungsansätze à 25µl Gesamtvolumen verteilt. Die *in vitro* Verpackung erfolgte unter den in 2.2.2. angegebenen Bedingungen. Aliquote Teile der *in vitro* verpackten DNA wurden sofort zur Bestimmung des Phagentiters mit den entsprechenden Bakterienstämmen (s. 3.1.6.) ausplattiert. Der Hauptanteil der *in vitro* erzeugten Phagen (zusammen 47µl) wurde vereinigt, mit 100µl SM-Medium verdünnt, mit 5µl Chloroform versetzt und über Nacht bei 4°C gelagert. Die so erzeugte cDNA-Bibliothek wurde zur Amplifikation auf LB-Agarplatten (s. 2.1.) von 150mm Durchmesser ausplattiert: Bakterien eines hfl-Stammes (Y 1073) wurden bis zu einer A₅₇₈ von 1,0 angezogen (s. 2.4.1.). Für eine Platte wurden 500µl dieser Bakterienkultur mit dem gleichen Volumen SM-Medium und ca. 30000 Phagen versetzt und zur Infektion 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 43°C in 10ml flüssige 0,7%ige Weichagarose (s. u.) gegeben, vermischt und ausplattiert. Die Platten wurden 6,5h bei 37°C inkubiert, so daß die im Bakterienrasen entstandenen Plaques einen Durchmesser von ca. 1mm hatten.

Die Phagen einer Platte wurden mit 5ml SM-Medium über Nacht bei 4°C eluiert. Das Eluat wurde abgezogen und jede Platte mit weiteren 2ml SM-Medium sowie 100µl Chloroform für 10min bei Raumtemperatur nacheluiert. Beide Phageneluate wurden vereinigt und die Bakterienreste in einer Tischzentrifuge pelletiert (10min, 0°C, 2500xg). Der Überstand wurde aliquotiert und in 5ml Glasgefäße überführt. Die amplifizierte cDNA-Bibliothek wurde über 0,5% Chloroform bei 4°C gelagert.

SM-Medium: 100mM NaCl
10mM MgSO₄
50mM Tris-HCl pH 7,4
0,01% Gelatine

Weichagarose: 0,7% Agarose
10mM MgSO₄
wurde im Mikrowellenherd verflüssigt und bei 43°C zum Ausplattieren benutzt.

2.4. Isolierung spezifischer Klone aus der cDNA-Bibliothek

2.4.1. Ausplattieren der cDNA-Bibliothek und Herstellung von Filterabzügen [52]

Bakterien des hfl1-Stammes Y1073 (s. 2.1.) wurden in LB-Medium, das 0,2% Maltose und 10mM MgSO₄ enthielt, bis zu einer A₅₇₈ von 1,0 angezogen. Die cDNA-Bibliothek wurde auf LB-Agarplatten von 150mm Durchmesser (30000 Phagen/Platte) entsprechend 2.3.11. ausplattiert. Nach dem Durchbrechen der Plaques (nach ca. 6,5h/37°C) wurden die Platten auf 4°C abgekühlt. Dies gibt dem Agar eine härtere Konsistenz, was die Herstellung von Filterabzügen wesentlich erleichtert. Für die Filterabzüge wurden Nylon-Rundfilter (Hybond N, Amersham) benutzt, die nicht weiter vorbehandelt werden mußten. Sowohl Platten als auch die zugehörigen Filter wurden nummeriert. Die Membranen wurden zentrisch auf die Agaroberfläche aufgelegt und ihre Position durch mehrfache Einstiche mit einer heißen Nadel gekennzeichnet. Zur Adsorption der Phagen(-DNA) wurden die Filter 2-5min auf der Agaroberfläche belassen und dann vorsichtig abgehoben. Mit der Phagenseite nach oben wurden die Nylonmembranen für jeweils 10min sukzessiv auf Filterpapier gelegt, das mit Denaturierungslösung (0,5M NaOH/1,5M NaCl) bzw. Neutralisierungslösung (0,5M Tris-HCl pH 8/1,5M NaCl) getränkt war. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurden die Filter 1-2h bei 80°C im Vakuumofen gebacken und konnten zur Plaquehybridisierung (s. 2.4.2.) eingesetzt werden. Die Agarplatten wurden bis zur Beendigung der Hybridisierung bei 4°C gelagert.

2.4.2. Plaquehybridisierung und Lokalisierung positiver Klone [53, 54]

Die Vorhybridisierung und Hybridisierung der an die Filter gebundenen Phagen-DNA wurde unter den in 2.15.1. beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Als ³²P-markierte Sonde diente nick-translatierte Plasmid-DNA (s. 2.8.2.). Es wurden 2-5x10⁶ cpm/ml zur Hybridisierung eingesetzt. Die Waschbedingungen entsprachen den unter 2.15.1. angegebenen.

Nach Autoradiographie (s. 2.13.) und Entwicklung des Röntgenfilms konnten die positiven Signale mit Hilfe der Markierungen auf Filter und Agarplatte (s. 2.4.1.) positioniert werden. Die lokalisierten Plaques wurden mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen. Zur Elution der Phagen wurde der Agarpfropfen in 400µl SM-Medium (s. 2.3.11.) gegeben und mindestens 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Diese als "Phagenstock" bezeichnete Suspension diente als Ausgangslösung zur Vereinzelung der Phagen. Unter sterilen Bedingungen und über 5% Chloroform bei 4°C gelagert sind die Phagen mehrere Jahre stabil.

2.4.3. Herkunft und Beschreibung der Klone pE1 und pE2

Die zur Plaquehybridisierung benutzten Klone pE1 und pE2 wurden von M. Vlahova [38] isoliert. Sie enthalten cDNAs estradiol-stimulierbarer Transkripte, die in die SphI-Schnittstelle des Plasmids pAT153 [56] einkloniert wurden. Die insertierten cDNAs

können durch Restriktion der Plasmid-DNA mit SphI isoliert werden. Dabei ist zu beachten, daß die isolierten cDNA-Fragmente, bedingt durch die Klonierungsstrategie, oligomere GC-Enden (ca. 20bp) tragen.

Längen (ohne GC-Enden): E1-cDNA 268nt
E2-cDNA 473nt

2.5. Präparation von λ -Phagen-DNA

2.5.1. Isolierung von λ gt10-DNA aus großen Lysaten zur Vektor-präparation [56, 57]

Zur Präparation von Vektor-DNA wurde der Phage λ gt10 [47] aus großen Lysaten (500ml) isoliert. - Der Titer eines Phagenstocks (s. 2.4.2.) wurde durch Ausplattieren einiger Phagenverdünnungen bestimmt, der Phagenstock anschließend zur Infektion verwendet. Eine Bakterienkultur E.coli C600 (s. 2.1.) wurde bis zu einer A_{578} von eins angezogen. Drei Milliliter dieser Kultur wurden mit 3ml SM-Medium (s. 2.3.11.) verdünnt und mit 20 μ l Phagen (ca. 4×10^6 pfu) 15min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der gesamte Ansatz zu 500ml LB-Medium (s. 2.1.), das 10mM MgSO₄ enthielt, gegeben und bei 37°C 10-12h geschüttelt. Die Isolierung der Phagen aus dieser Kultur folgte - abgesehen von geringfügigen Modifikationen - dem bei Maniatis [51] angegebenen Verfahren.

2.5.2. Isolierung von λ gt10-DNA aus kleinen Lysaten

Ein Plaque mit den gewünschten Lambda-Phagen wurde aus einer Agarplatte ausgestochen und in 1ml SM-Medium (s. 2.3.11.) gegeben. Die Phagen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur eluiert. 300 μ l Bakterienkultur (Y1073 mit einer $A_{578}=1$) wurden zur Präadsorption mit dem gleichen Volumen SM-Medium und 20-50 μ l des Phageneluats 15min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 5ml NZ-Medium wurde die Kultur 7-12h bei 37°C geschüttelt und mit geringen Änderungen [58] nach dem bei Maniatis [51] beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Die isolierte Phagen-DNA wurde in 20-30 μ l TE (s. 2.3.9.) gelöst. Zur Restriktion wurden 2-5 μ l dieser Lösung eingesetzt.

NZ-Medium: 10g NZ-Amin
 5g Hefeextrakt
 5g NaCl
 2g MgSO₄
 1g Casaminoäuren
ad 1l mit H₂O, pH 7,5 einstellen und autoklavieren

2.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Alle beschriebenen Methoden (s.u.) lieferten DNA, die für die gängigen Enzymreaktionen (DNA-Markierungen, Restriktionen etc.) eingesetzt werden konnte. Das für die jeweiligen Erfordernisse optimale Verfahren wurde angewendet.

2.6.1. "Freeze-Squeeze"-Methode

Kleinere DNA-Fragmente ($\leq 1,2$ kb) aus möglichst niederprozentigen Agarosegelen ($\leq 1\%$ Agarose) wurden in 300mM Natriumacetat pH 7/1mM EDTA-Lösung äquilibriert und nach der Methode von Tautz und Renz [59] eluiert. Die DNA-enhaltenden Gelstücke wurden dabei möglichst eng ausgeschnitten, um die Agarosemenge gering zu halten. Die Methode lieferte nur mit hochschmelzender Agarose befriedigende Ausbeute (60-70% der eingesetzten DNA). Der Zeitbedarf für eine Extraktion beträgt mindestens 1 1/4h.

2.6.2. Extraktion mittels Cetyltrimethylammoniumbromid

Geringe Mengen an DNA-Fragment wurden aus niedrighschmelzenden Agarosegelen durch QN' - mit Modifikationen [60] - nach Langridge et al. [61] isoliert. Die Ausbeuten betrugen durchschnittlich über 80%. Die Extraktion dauert ca. 35min.

2.6.3. Extraktion mit "Glasmilch"

Eine sehr schnelle Methode (ca. 20min.), die für größere DNA-Mengen ($> 0,5\mu\text{g}$) angewendet wurde, ist die Extraktion nach Vogelstein und Gillespie [62]. Dieses Verfahren eignet sich für die Isolierung von DNA sowohl aus niedrig- als auch aus hochschmelzender Agarose, wenn TAE-Puffersysteme (s. 2.12.2.) verwendet werden. Die erforderliche Glasmilch einschließlich der benutzten Lösungen wurde bei Bio101 Inc. (La Jolla, Cal. USA) käuflich erworben und nach den Herstellerangaben eingesetzt.

2.7. Isolierung von Plasmid-DNA

2.7.1. Präparative Plasmidisolierung

Zur Präparation von Plasmid-DNA hoher Reinheit und Ausbeute wurden 500ml Kulturen des plasmidtragenden E.coli-Stammes in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Nach 10-12stündigem Wachstum unter starkem Schütteln wurden die Bakterien durch alkalische Lyse nach dem von R. Heiermann beschriebenen Verfahren [60], das sich stark an das von Birnboim und Doly [63] anlehnt, aufgeschlossen.

2.7.2. Analytische Plasmidpräparationen

Minipräparationen von Plasmid-DNA erfolgten aus 2ml Kulturen. Nach 7-8h Wachstum (37°C , LB-Medium) unter starkem Schütteln wurden 1,5ml Bakterien durch alkalische Lyse [63] wie bei Maniatis [51] beschrieben aufgeschlossen. Im Gegensatz zur o. g. Methode wurde die Lyse mit 0,2N NaOH/1% SDS-Lösung bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ausbeute der erhaltenen Plasmid-DNA war für mehrere Restriktionsverdauungen (s. 2.17.1.) ausreichend.

2.8. Radioaktive Markierung von DNA

2.8.1. Endmarkierungen

Überstehende dephosphorylierte 5'-Enden wurden mit dem 1,5-2fachen molaren Überschuß an γ - ^{32}P -ATP kinasiert [64]. Zur Markierung wurden γ - ^{32}P -ATP (spez. Akt. 6000Ci/mmol), DNA-Fragment und 4-10U T4 Polynukleotid-Kinase in Kinasepuffer (s. 2.3.5.) vermischt und 2-10h bei 37°C inkubiert. Durch 5minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 65°C wurde das Enzym inaktiviert.

2.8.2. "Nick-Translation"

Zur Plaquehybridisierung (s. 2.4.2.) wurden Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente ($\geq 1\text{kb}$) durch Nick-Translation [65] radioaktiv markiert.

Ansatz: 1 μl Plasmid-DNA (100-200ng)
2 μl 10x NT-Puffer
4 μl dCTP, dTTP, dGTP-Mix (je 1mM)
4 μl α - ^{32}P -dATP (40 μCi , spez. Akt. 800Ci/mmol)
1 μl DNase I (1:6000 Verdünnung einer 1mg/ml Stammlösung)
7 μl H_2O

Der Ansatz wurde 2min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf 16°C abgekühlt. Nach Zugabe von 1 μl (3,5U) DNA-Polymerase I wurde die Markierung für 30-45min bei 16°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 μl Stopp-Mix beendet. Die nicht eingebaute Radioaktivität wurde durch Gelfiltration über eine G75-Sephadexsäule (Säulenvolumen 5ml) abgetrennt. Bei Markierungen mit einem radioaktiven Nukleotid wurden Einbauraten von $\geq 30\%$ und spezifische Aktivitäten von max. $1 \times 10^6 \text{cpm}/\mu\text{g}$ DNA erreicht.

Puffer für die Gelfiltration:
10mM Tris-HCl pH 7,4
10mM EDTA

10x NT-Puffer:
500mM Tris-HCl pH 7,4
100mM MgSO_4
1mM DTT
0,5mg/ml BSA
lagern bei -20°C

Stopp-Mix:
100mM EDTA
50% Glycerin
0,1% Dextranblau

2.8.3. Markierung von DNA mit Hilfe von Hexanukleotid-Primern

Lösungen:

DTM	250mM Tris-HCl pH 8
	25mM MgCl ₂
	50mM β -Mercaptoethanol
	100 μ M dGTP
	100 μ M dTTP
	100 μ M dCTP
OL	1mM Tris-HCl pH 7,4
	1mM EDTA
	90A ₂₆₀ /ml Hexanukleotide
HEPES	1M pH 6,6
Mix-A	25 Teile HEPES
	25 Teile DTM
	7 Teile OL

Diese auch als "oligo-labeling" bezeichnete Methode [66, 67] diente zur Herstellung von Sonden hoher spezifischer Aktivität (10⁹cpm/ μ g DNA) wie sie z.B. bei Northern-Hybridisierungen (s. 2.15.2.) benötigt wurden.

In einem Volumen von 50 μ l wurden 25 μ l Mix-A, 20-50 μ Ci α -³²P-dATP, 2 μ l BSA (10mg/ml) mit 25-50ng der hitzedenaturierten DNA (7min, 90°C) zusammengegeben. Nach Zugabe von 2-6U Klenow-Fragment wurde entweder 2-12h bei Raumtemperatur oder 2-3h bei 37°C markiert. Die nicht eingebaute Radioaktivität wurde wie in 2.8.2. abgetrennt. Dieses Verfahren wurde immer dann benutzt, wenn nur geringe DNA-Mengen zur Verfügung standen. Es eignet sich besonders zur effizienten Markierung kleiner DNA-Fragmente. Eine Reinigung der DNA-Fragmente von Agarose vor der Markierung war nicht notwendig.

2.9. Subklonierungen in verschiedene Vektoren

Alle ursprünglich aus λ gt10 [47] isolierten cDNAs wurden entweder in Plasmide (pUC18 [68], pAT153 [55], pBluescript [Stratagene Cloning Systemes]), oder in die replikative Form der Phagen M13 mp18/19 [41] subkloniert. Neben der schnelleren und weniger aufwendigen Isolierung der cDNAs bei höherer Ausbeute, ermöglichte dies auch ihre einfache Sequenzierung.

2.9.1. Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Kompetente Bakterien [69] wurden hergestellt und transformiert wie bei R. Seidel [70] angegeben. Sollten sehr hohe Transformationsraten erzielt werden, wurden die Verfahren nach Hanahan [71, 72] angewendet.

2.9.2. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Nach einstündiger Restriktion der DNA (0,5-5µg) wurde 1U alkalische Phosphatase pro pmol 5'-Ende zum Verdauungsansatz gegeben und die Reaktion für eine Stunde bei 37°C fortgesetzt. Anschließend wurden die Enzyme durch Phenol- sowie zweimalige Chloroformextraktion entfernt, die DNA aus 0,4M LiCl präzipitiert und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen.

2.9.3. Ligationen

Das molare Verhältnis von Vektor- zu Fragment-DNA variierte je nach Länge der zu klonierenden DNA zwischen 1:1 und 1:3. Üblicherweise wurden in einem Gesamtvolumen von 10µl 50ng Vektor-DNA mit der entsprechenden Menge Fragment-DNA gemischt und mit 1U T4 DNA-Ligase in Ligasepuffer mit 0,6mM ATP inkubiert. Nach einer Reaktionszeit von 2-10h bei 12°C wurde das Enzym 5min bei 65°C inaktiviert.

10xLigationspuffer: 200mM Tris-HCl pH 7,6
100mM MgCl₂
100mM DTE

2.10. Klonieren in M13-Phagen

Transformationen mit der doppelsträngigen replikativen Form (RF) der M13-Phagen-DNA wurden wie mit Plasmid-DNA entsprechend 2.9.1. durchgeführt. Die RF sowie die einzelsträngige (ss) DNA der filamentösen Phagen M13 mp18/19 konnten parallel aus einer Kultur isoliert werden. Gleiche Volumina einer hochtitrigen Phagenstocklösung (s. 2.4.2.) und einer Übernachtskultur JM101, JM103 oder JM109 (s. 2.1.) wurden 1:100 mit LB-Medium verdünnt und für max. 7h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Bakterien (1,5ml) wurden abzentrifugiert (3min Eppendorfzentrifuge). Das Bakterienpellet und der Überstand wurden getrennt aufgearbeitet (s. 2.10.1. u. 2.10.2.).

2.10.1. Präparation doppelsträngiger M13-DNA

Das Bakterienpellet (s.2.10.), das die RF-Phagen-DNA enthält, wurde nach der Vorschrift für Plasmid-Minipräparationen (s. 2.7.2.) aufgearbeitet.

2.10.2. Präparation einzelsträngiger M13-DNA

Die ss DNA wurde aus dem Überstand einer E.coli-Kultur (s. 2.10.) nach der von Messing und Vieira beschriebenen Methode [73] präpariert.

2.10.3. Bestimmung der Orientierung einklonierter Fragmente

Die Orientierung der einklonierten Fremd-DNA wurde entweder durch Restriktionsanalysen oder durch Hybridisierungen der ss DNAs untereinander bestimmt.

Da die ss DNAs der M13-Phagen immer den (+)-Strängen der RF DNAs entsprechen, können sie immer dann gegeneinander hybridisiert werden, wenn die einklonierten Fremd-DNAs gegenläufig orientiert sind. Phagen, die die gleiche Fremd-DNA enthielten, hybridisierten, indem je 20µl Phagenüberstand mit 2µl TES (200mM Tris-HCl pH7,9, 10mM EDTA, 400mM NaCl) vermischt und 1,5h bei 67 °C inkubiert wurde. Die Proben wurden mit 15% Glycerin und etwas Bromphenolblau versetzt und bei 4°C auf 0,8%igen Agarosegelen (70V konstante Spannung) aufgetrennt.

2.11. DNA-Sequenzierungen nach dem Kettenabbruchverfahren

Sequenzierungen von Restriktionsfragmenten wurden nach der von Sanger et al. [74] beschriebenen Strangterminationsmethode durchgeführt.

Zur Hybridisierung wurden 2-5µl (ca. 1µg) Einzelstrang-DNA (s. 2.10.2.) mit 1µl eines Sequenzierungsprimers (0,03A₂₆₀/ml, Pharmacia) und 1µl TM-Puffer in einem Endvolumen von 10µl zusammengegeben. Der Ansatz wurde 5min auf 65°C erhitzt und über einen Zeitraum von 1/2h auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 1µl (10µCi) α-³²P-dATP (spez. Akt. 800Ci/mmol) sowie 1µl (1U) Klenow-Fragment wurden 4x2,5µl dieses Ansatzes auf die Reaktionsgefäße mit den basenspezifischen ddNTP/dNTP-Lösungen verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 15min bei Raumtemperatur wurden jeweils 2µl dNTP-Lösung zugegeben und die Reaktion für weitere 15min fortgesetzt. Die Reaktionen wurden mit je 4µl Probenpuffer (s. 2.12.3.) abgestoppt. Je 1µl pro Reaktion wurde auf einem Sequenziergel aufgetrennt.

Für Sequenzierreaktionen mit α-³⁵S-dATP (spez. Akt. 500Ci/mmol) wurden 15µCi pro Ansatz eingesetzt und außerdem die Reaktionszeit auf 20min verlängert. Auf die Sequenziergele wurde i. Vgl. zu Reaktionen mit α-³²P-dATP das doppelte Volumen aufgetragen. Um 'Stopps' zu unterdrücken, wurden manche Reaktionen bei 42°C durchgeführt. DNA-Regionen mit hohem GC-Gehalt wurden zur Vermeidung von Gelartefakten mit 7-Desaza-dGTP [75] anstelle von dGTP sequenziert.

TM 100mM Tris-HCl pH 8
 50mM MgCl₂

dNTP-Lösung:
je 0,25mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP in TE pH 7,4

ddNTP/dNTP-Lösungen (Angaben in μ l)

	T	C	G	A
0,5mM dATP	1	1	1	1
0,5mM dTTP	12,5	250	250	250
0,5mM dCTP	250	12,5	250	250
0,5mM dGTP	250	250	12,5	250
10mM ddTTP	25	--	--	--
10mM ddCTP	--	4	--	--
10mM ddGTP	--	--	8	--
10mM ddATP	--	--	--	4
TE	500	500	500	250

2.11.1. Sequenzierungen mit modifizierter T7 DNA-Polymerase

Sequenzierungen mit modifizierter T7 DNA-Polymerase (SequenaseTM) wurden nach dem Protokoll des Herstellers (USB Corporation, Ohio, USA) durchgeführt. Dieses Enzym ermöglichte eine Reduzierung der einzusetzenden Radioaktivität (α -³⁵S-dATP, spez. Akt. 500Ci/mmol) auf 5 μ Ci pro Sequenzierungsansatz. Außerdem verkürzten sich die Reaktionszeiten auf insgesamt 10min.

2.12. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.12.1. Auftrennung von RNA in Methylquecksilberhydroxid- und Formaldehydgelen

a) Methylquecksilberhydroxidgele [76]

Die RNA (0,5-5 μ g) wurde in 2x Probenpuffer denaturiert und auf 0,8-1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 6V/cm in 1x Laufpuffer. Durch halbstündige Inkubation der Gele in 0,5M Ammoniumacetat mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid und 15minütiges Wässern konnte die RNA angefärbt werden.

1x Laufpuffer pH 8:

10mM Na₂SO₄
5mM Na₂B₄O₇·x10H₂O
50mM H₃BO₃

2x Probenpuffer:

25 μ l CH₃HgOH
500 μ l 4x Laufpuffer
230 μ l 86%iges Glycerin
0,2% Bromphenolblau
0,2% Xylencyanol FF
ad 1ml mit H₂O

b) Formaldehydgele [77, 78]

Sollte die RNA nach der Elektrophorese auf Nylonmembranen transferiert werden (s. 2.14.), erfolgte ihre Auftrennung in 0,8-1%igen Agarosegelen, die 6,5% (v/v) Formaldehyd enthielten. Die RNA (5-20 μ g) wurde mit 4 Volumen FA-Probenpuffer versetzt, 15min bei 60°C denaturiert und sofort aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 4°C und 1,5V/cm in 1x MOPS als Laufpuffer durchgeführt.

FA-Probenpuffer: 178µl 12,3M Formaldehyd
 500µl Formamid
 100µl 10x MOPS
 22µl 2% Bromphenolblau/Xylencyanol FF

10x MOPS pH 7,0: 0,20M MOPS
 0,05M NaAc
 0,01M Na₂EDTA
 max. 15min autoklavieren.

2.12.2. Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Restriktionsanalyse wurden in der Regel 0,7-1,2%ige Agarosegele benutzt. Sowohl der Laufpuffer (1x TEB: 89mM Tris-Borat pH 7,8, 2mM EDTA) als auch die Gele enthielten 0,5µg/ml Ethidiumbromid. Sollte ein DNA-Fragment extrahiert werden, wurde TAE (40mM Tris-Acetat pH 7,8, 1mM EDTA) als Laufpuffer benutzt. Probenpuffer s. 2.17.1.. Der Gelpuffer hatte jeweils die gleiche Zusammensetzung wie der Laufpuffer.

2.12.3. Elektrophorese von DNA in Polyacrylamid(PAA)-Gelen

Dem Trennproblem entsprechend wurde die DNA auf 3-18%igen, denaturierenden PAA-Gelen aufgetrennt. Die Gele hatten eine Dicke von 0,5mm und enthielten 8M Harnstoff als denaturierendes Agens. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid betrug immer 20:1 (w/w). Als Laufpuffer wurde TEB (s.2.12.2.) benutzt. Vor der Aufgabe wurde die DNA in Probenpuffer (95% Formamid, 5mM EDTA, je 0,1% Xylencyanol FF, Bromphenolblau) 3min bei 95°C denaturiert und in Eis abgekühlt.

Sequenzierungsproben wurden auf 4%igen 8M Harnstoff-PAA-Gelen elektrophoretisiert [79]. Um eine optimale Auflösung zu erreichen, wurden 55cm lange Gele, deren Dicke von 0,2mm auf 0,4mm zunahm, benutzt. Die Gelplatten wurden thermostatiert (48°C) und gehörten zu einer Macrophor-Elektrophoreseapparatur (Hersteller LKB, Gräfelfing). Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (1,5kV) durchgeführt.

2.13. Autoradiographie [80]

Sowohl Agarose- als auch Acrylamidgele wurden vor der Autoradiographie getrocknet. Gele und Blots mit ³²P-markierten Nukleinsäuren wurden bei -70°C auf Röntgenfilmen (Fuji RX) exponiert. Die Filme wurden mit einem Blitzlicht sensibilisiert. Zur Verkürzung der Belichtungszeiten wurden Verstärkerfolien (Cronex, Dupont) benutzt. Sequenziergele mit ³⁵S-markierter DNA wurden mit 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan auf einer Glasplatte fixiert, getrocknet und bei Raumtemperatur auf Agfa-Röntgenfilmen exponiert (12h).

2.14. Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Nukleinsäuren wurden aus Agarosegelen nach der von Southern beschriebenen Methode [83] durch Diffusion auf Nylonmembranen (Hybond N oder Nytran) transferiert.

Die DNA wurde nach der Elektrophorese durch Inkubation des Gels für 20min in 1,5M NaCl/0,5M NaOH-Lösung denaturiert. Nach Neutralisieren in einem Puffer aus 1,5M NaCl/1M Tris-HCl pH 8 erfolgte der Transfer der DNA in 20xSSC (3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat pH 7) innerhalb von 4-12 Stunden bei Raumtemperatur (Southern-Blot). Die Membranen wurden anschließend 30min bei 80°C im Vakuumofen gebacken und zur Hybridisierung eingesetzt.

Der Transfer von RNA aus Formaldehyd-Agarosegelen (Northern-Blot) wurde analog durchgeführt. Allerdings entfiel die NaOH-Behandlung, stattdessen wurden die Gele in Wasser äquilibriert. Außerdem wurden die Nylonmembranen nach dem Backen zusätzlich mit UV-Licht bestrahlt (254nm, Abstand 15cm, Bestrahlungszeit 2min, 60W UV-Röhre), um die transferierte RNA kovalent an die Membranen zu fixieren.

2.15. Hybridisierungen [81, 82]

Alle Nylonmembranen mit immobilisierten Nukleinsäuren wurden ohne die radioaktive Probe in der entsprechenden Hybridisierungslösung (s. 2.15.1. & 2.15.2.) prähybridisiert, um die unspezifische Bindung der markierten Sonde an die Filtermembranen zu unterdrücken. Nach 1-2stündiger Vorinkubation wurde die Hybridisierungslösung erneuert und die ^{32}P -markierte Probe zugesetzt. Die Dauer der Hybridisierung war so ausgelegt, daß mindestens $2 \times c_0 t_{1/2}$ erreicht wurde [51]. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter zur Reduktion der Hintergrundstrahlung mit steigender Stringenz gewaschen (s. 2.15.1./2.)

2.15.1. Hybridisierung an immobilisierte DNA [83, 84] ("Southern")

Gescherte Lachssperma-DNA (100µg/ml) wurde zusammen mit der ^{32}P -markierten Probe ($1-5 \times 10^6$ cpm/ml) hitzedenaturiert und in die Hybridisierungslösung gegeben.

Hybridisierungslösung:	6x SET
	5x Denhardt's [84]
	0,5% SDS

Hybridisierungstemperatur:	65°C
----------------------------	------

Hybridisierungsdauer:	4-24h
-----------------------	-------

Waschbedingungen:	1.) 5min in 1xSSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur
	2.) 4x30min 1xSSC/0,1% SDS bei 65°C

Lösungen:

20xSET	100xDenhardt's [84]
3M NaCl	2% (w/v) BSA
0,4M Tris-HCl pH 7,8	2% (w/v) Ficoll 400
0,02M EDTA	2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon

SSC s. 2.14.

2.15.2. Hybridisierung an immobilisierte RNA [81, 85, 86]
("Northern")

Hybridisierungslösung: 5x SET pH 7,4
50% (v/v) Formamid
5x Denhardt's
10% (w/v) Dextransulfat
200µg/ml gescherte Lachssperma-DNA

Lachssperma-DNA und ^{32}P -markierte Probe (10^6 - 10^7 cpm/ml) wurden vor Beginn der Hybridisierung hitzedenaturiert.

Hybridisierungstemperatur: 42°C

Hybridisierungszeit: 12-48h

Waschbedingungen:

- 1.) 5min in 4xSSC bei 42°C
- 2.) 2x in 1xSSC/0,1% SDS bei 42°C für 30min
- 3.) 2x in 1xSSC/0,1% SDS bei 65°C für 30min
- 4.) 1x in 0,1xSSC/0,1% SDS bei 65°C für 30min

2.16. Isolierung von RNA aus verschiedenen Rattengeweben
[87, 88, 89]

2.16.1. Gewebeaufschluß und Extraktion der Gesamt-RNA

Puffer und Lösungen:

Guanidinpuffer: 5M Guanidinisothiocyanat
2% Natrium-Lauroylsarkosinat
50mM Tris-HCl pH 7,8
50mM EDTA
5% β -Mercaptoethanol
Lagerung bei -20°C

VRC (Vanadylribonukleosid-Komplex) wurde selbst hergestellt [51] und bei -70°C unter Argon gelagert.

SDS-Puffer: 10mM Tris-HCl pH 7,4
0,1% SDS
5mM EDTA

CsCl-Lösung: 5,7M CsCl
0,1M EDTA

Die Ratten wurden durch cervicale Dislokation getötet und die entsprechenden Organe möglichst schnell entnommen. Bindegewebe und Blutreste wurden entfernt, das Organ mit einem Skalpell zerkleinert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebestücke wurden in gefrorenem Zustand unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einem zylindrischen Stahlgefäß mit einem eingepaßten Pistill zermörsert. Das pulverisierte Gewebe wurde in das mindestens 5fache Volumen Guanidinpuffer, dem 10mM VRC zugesetzt worden war, gegeben. Bei Raumtemperatur wurde diese Mischung in kurzen Impulsen (5-10s), gefolgt von Abkühlphasen, mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Wenn die Suspension homogen und genügend dünnflüssig war, wurden die Gewebetrümmer in einer Sigma-Tischzentrifuge (5min/4000rpm/23°C) abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit einem Volumen Chloroform extrahiert oder direkt auf ein CsCl-Kissen geschichtet und erneut zentrifugiert. Bedingungen:

SW41-Rotor, 30000rpm, 24,5h, 23°C
Kissen aus 3ml CsCl-Lösung
oder
SW60-Rotor, 33000rpm, 16h, 23°C
Kissen aus 1,5ml CsCl-Lösung

Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und verworfen. Das klare RNA-Pellet wurde in SDS-Puffer gelöst. - Bei einem RNA-Endgehalt von $\approx 2,5\text{mg/ml}$ kann dies bei Raumtemperatur bis zu 3h dauern. - Die Gesamt-RNA wurde aus 0,3M Natriumacetat mit 2,2 Volumen Ethanol gefällt, das Präzipitat dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen.

2.16.2. Isolierung polyadenylierter RNA

Die Anreicherung der poly(A⁺)-RNA erfolgte durch Affinitätschromatographie an oligo(dT)-Cellulose [90, 91]. Alle benutzten Lösungen wurden mit Zellkulturwasser angesetzt, das zuvor mit Diethylpyrocarbonat behandelt worden war. Die Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert. Die RNA wurde in Wasser gelöst, 5min auf 65°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf die oligo(dT)-Säule aufgegeben. Der Durchfluß wurde aufgefangen und zwei weitere Male aufgetragen. Zum Schutz vor RNasen wurde wässrigen RNA-Lösungen RNasin (72U/ml) [92] zugesetzt.

2.17. Sonstige Methoden

2.17.1. Restriktion von DNA

Restriktionsverdauungen wurden unter Standardbedingungen im "Drei-Puffer-System" nach Maniatis [51] durchgeführt. War dies nicht möglich, so wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer benutzt. Nach Beendigung der einstündigen Inkubationszeit wurden die Proben 5min auf 65°C erhitzt. Zur elektrophoretischen

Auftrennung der entstandenen Fragmente wurden die Ansätze mit 1/4 Volumen 5x Probenpuffer vermischt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

5x Probenpuffer: 20% Ficoll 400
100mM EDTA
0,1% Bromphenolblau
0,1% Xylencyanol FF

2.17.2. TCA-Präzipitation von Nukleinsäuren

Radioaktiv markierte DNA (50-100ng) wurde mit 20µg tRNA versetzt und mit Wasser auf 160µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 40µl 50%iger TCA wurde 15min auf Eis gefällt. Das Präzipitat wurde in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert, zweimal mit 150µl 5%iger TCA gewaschen und getrocknet. Die eingebaute Radioaktivität wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt.

2.17.3. Auswertung der Sequenzdaten

Die Suche nach Sequenzhomologien in der 'Genetic Sequence Databank' (National Institute of Health, 1987) und in der 'Protein Databank' (National Biomedical Research Foundation, 1987) sowie das Einlesen und Bearbeiten der Sequenzen erfolgte mit dem MicroGenie Sequenz-Analyseprogramm (Beckman Instruments Inc.) [93].

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung der cDNA-Bibliothek

Zwei estradiolstimulierbare Transkripte E1 und E2 aus Ratten-C6 Glioma-Zellen wurden von M. Vlahova durch die entsprechenden, unvollständigen cDNA-Klone pE1 und pE2 identifiziert. Die Transkriptlänge von E1 wurde mit ca. 1,6kb, die von E2 mit ca. 1,3kb bestimmt. Die entsprechenden cDNA-Klone in dem Vektor pAT153 entstammten einer Plasmid-cDNA-Bibliothek mit 25000 Rekombinanten und enthielten insertierte cDNAs einer Länge von 268bp (pE1) bzw. 473bp (pE2) [38]. Die limitierte Anzahl der Rekombinanten sowie die geringen Längen der cDNAs in dieser cDNA-Bank machte die Herstellung einer neuen cDNA-Bibliothek aus der gleichen RNA notwendig. Lange cDNAs, die volle Transkriptlängen repräsentieren, sowie eine hohe Zahl an cDNA-Klonen sollten durch eine Größenselektion und die Verwendung eines Phagenvektors, der *in vitro* verpackt werden konnte, erreicht werden.

3.1.1. RNA-Isolierung aus der Ratten-C6 Glioma-Zelllinie

Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde RNA aus der C6 Glioma-Zelllinie benutzt. Die Zellen waren vor der Extraktion der RNA für 4h mit $10^{-6}M$ 17 β -Estradiol inkubiert worden, um die Synthese estradiolsensitiver Transkripte zu stimulieren. Die Gesamt-RNA wurde von M. Vlahova isoliert und überprüft [38]. Aus 1,2mg Gesamt-RNA wurden durch zweimalige Chromatographie an oligo(dT)-Cellulose (s. 2.3.1.) 22 μ g poly(A⁺)-RNA gewonnen, was ca. 2% der aufgegebenen Gesamt-RNA entspricht. Der salzfreien, wässrigen poly(A⁺)-RNA-Lösung wurde 1U/ μ l RNasin [92, 94] zugesetzt.

3.1.2. Optimierung der Aktivität der M-MLV Reversen Transkriptase

Da die zur Verfügung stehende Menge an C6 Glioma-poly(A⁺)-RNA limitiert war (s. 3.1.1.), wurden alle Schritte der cDNA-Synthese durch Parallelansätze mit HeLa-poly(A⁺)-RNA oder polysomaler poly(A⁺)-RNA aus Kaninchen-Skelettmuskel kontrolliert bzw. in Vorversuchen optimiert.

Ein kritischer Schritt bei der Herstellung der cDNA ist die Synthese des ersten Stranges. Für Avian Myeloblastosis Virus (AMV) Reverse Transkriptase ist bekannt, daß die Anwesenheit von K⁺-Ionen einen großen Einfluß auf die Ausbeute und auf die Länge der entstandenen Transkripte hat [95]. Da für die M-MLV Reverse Transkriptase, die in dieser Arbeit ausschließlich benutzt wurde, solche Untersuchungen nicht bekannt waren, wurde die optimale Konzentration an K⁺-Ionen für die Synthese des ersten Stranges in Vorversuchen ermittelt. In Parallelansätzen, in denen nur die KCl-Konzentrationen variierten, wurde einzelsträngige cDNA synthetisiert (s. 2.3.2.) und auf denaturierenden PAA-Gelen aufgetrennt.

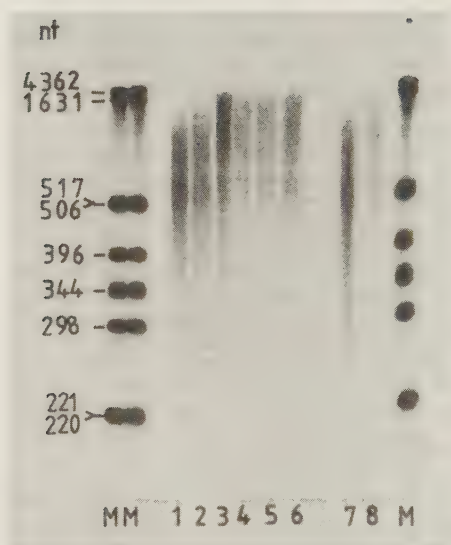
Aus den Abb. 1A/B ist ersichtlich, daß die KCl-Konzentration im Reaktionsansatz über einen großen Bereich (0-75mM KCl) schwanken darf, ohne daß die Längenverteilung der synthetisierten cDNAs negativ beeinflußt wird. Bei KCl-Konzentrationen >100mM KCl nimmt die durchschnittliche Länge der cDNAs stark ab. Dies zeigt sich besonders in Abb. 1B: Die zur reversen Transkription benutzte Kaninchen-poly(A⁺)-RNA aus membrangebundenen Polysomen war größenselektiert [96, 97], so daß infolge der fehlenden Auftrennung der PAA-Gele im Bereich >1,6kb alle längeren cDNAs eine "Bande" bildeten. Durch die Abnahme längerer Transkripte bei KCl-Konzentrationen um 100mM wird diese "Bande" schwächer, bis sie bei 150mM KCl ganz verschwindet.

Anhand von Abb. 1A wird deutlich, daß der Einbau an α -³²P-dATP, der ein Maß für die synthetisierte Menge an cDNA darstellt, bei 60mM KCl am höchsten ist. In Abb. 1B ist der Einbau bei 75mM KCl am höchsten. Das Optimum der KCl-Konzentration bei der Synthese einzelsträngiger cDNA mit M-MLV Reverser Transkriptase liegt also zwischen 60 und 75mM KCl. Da das Gel in Abb. 1B zeigt, daß bei 75mM KCl auch die nach Länge angereicherte polysomale RNA gut transkribiert wurde, wurde diese KCl-Konzentration als Standardwert für die folgenden cDNA-Synthesen gewählt.

Erfahrungsgemäß tendiert AMV Reverse Transkriptase dazu, am neugebildeten ersten cDNA-Strang zurückzulaufen und so teilweise den zweiten cDNA-Strang zu synthetisieren. Diese Umkehrreaktion führt zu Haarnadelstrukturen am 3'-Ende des cDNA-Transkriptes [98, 99] und damit zu Strukturen, die nicht mit Linkern versehen werden können. Letztlich können diese cDNAs also nicht kloniert werden. Actinomycin D unterdrückt diese Rückreaktion der AMV Reversen Transkriptase.

Inwieweit M-MLV Reverse Transkriptase diese Rückreaktion zeigt, wurde in Vorversuchen geklärt: cDNAs, die ohne Actinomycin D im Ansatz synthetisiert wurden, waren gut klonierbar. Ihre Auftrennung auf denaturierenden Agarosegelen nach der Synthese des zweiten Stranges zeigte, im Vergleich zur Synthese des ersten Stranges, keine erkennbare Zunahme an längeren cDNAs infolge von Haarnadelstrukturen an den 3'-Enden der cDNA-Transkripte (s. Abb. 3). Im direkten Vergleich einer Synthese einzelsträngiger cDNA mit bzw. ohne Actinomycin D (s. Abb. 1A, Spur 7 u. 8) wird deutlich, daß in Anwesenheit von Actinomycin D (Abb. 1A, Spur 7) mit M-MLV Reverser Transkriptase zwar größere Mengen an cDNA synthetisiert werden, diese cDNAs aber durchschnittlich kürzer sind. Aus diesem Grund wurde auf den Zusatz von Actinomycin D verzichtet.

A



B

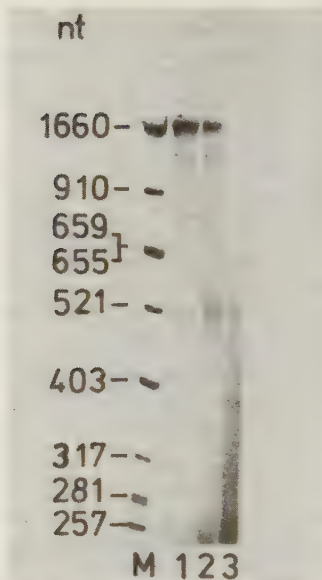


Abb. 1:

Einfluß der K^+ -Ionenkonzentration auf die Synthese des ersten cDNA-Stranges

A: Poly(A⁺)-RNA (je 2 µg) aus HeLa-Zellen wurde mit M-MLV Reverser Transkriptase (je 400U) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (s. 2.3.2.). Die bis auf die KCl-Konzentrationen identischen Parallelansätze enthielten je 10 µCi α -³²P-dATP (spez. Akt. 800 Ci/mmol) zur Markierung der neusynthetisierten cDNA. Die Reaktionen wurden mit 30 mM EDTA gestoppt, und je 1/10 ($\approx$ 350 ng cDNA entsprechend 6000 cpm) des Gesamtvolumens wurde auf einem 4%igen Harnstoff-PAA-Gel aufgetrennt und autoradiographiert. Die Ansätze enthielten folgende KCl-Konzentrationen: Spur 1, 120 mM; Spur 2, 100 mM; Spur 3, 60 mM; Spur 4, 40 mM; Spur 5, 20 mM; Spur 6, 0 mM. Die in Spur 7 gezeigte cDNA ($\approx$ 200 ng) wurde mit 75 mM KCl in Gegenwart von 50 µg/ml Aktinomycin D synthetisiert. Spur 8 zeigt die Vergleichsprobe ohne Aktinomycin D. In den mit M bezeichneten Spuren wurden ³²P-endmarkierte Fragmente des mit HinfI bzw. EcoRI geschnittenen Plasmids pBR322 aufgetragen [121]. Die zugehörigen Längen sind in Nukleotiden angegeben.

B: Einzelsträngige cDNA wurde wie unter A beschrieben aus poly-somaler Kaninchen-poly(A⁺)-RNA hergestellt. Die Ansätze enthielten folgende KCl-Konzentrationen: Spur 1, 75 mM; Spur 2, 100 mM; Spur 3, 150 mM. Jeweils 200 ng cDNA ($\approx$ 4000 cpm) wurden pro Spur auf einem 3%igen PAA-Gel, das 8 M Harnstoff enthält, aufgetrennt und autoradiographiert. In der mit M bezeichneten Spur wurden ³²P-endmarkierte Restriktionsfragmente des Plasmids pYH48/AluI [122] aufgetrennt. Die Fragmentlängen sind in Nukleotiden angegeben.

3.1.3. Synthese des ersten und zweiten cDNA-Stranges

Die zur Klonierung benötigte ds cDNA sollte im Idealfall eine vollständige Kopie der entsprechenden mRNA darstellen. Eine notwendige Voraussetzung, um dies zu erreichen, ist die reverse Transkription der RNA über ihre gesamte Länge in ss cDNA. Dieser Schritt ist sowohl in bezug auf die Länge, als auch auf die Ausbeute (s. Abb. 4) der ds cDNA limitierend. Lange Transkripte sollten durch den Einsatz von M-MLV Reverser Transkriptase, die im Gegensatz zur AMV Reversen Transkriptase keine Endonukleaseaktivität [100] und eine reduzierte RNase-Aktivität [101, 102] enthält, ermöglicht werden.

Die Synthese des ersten cDNA-Stranges wurde unter den optimierten Bedingungen (s. 3.1.2.) bei 75mM KCl und ohne Actinomycin D durchgeführt. Die Syntheseausbeuten, die durch Zusatz von α - 32 P-dATP und anschließende TCA-Fällung (s. 2.17.2.) bestimmt wurden, lagen zwischen 10% und 25%, bezogen auf die eingesetzte RNA-Menge. Der zweite cDNA-Strang wurde nach der Methode von Gubler und Hoffman [50] durch DNA-Polymerase I synthetisiert. Dabei wird die RNA innerhalb des RNA/cDNA-Hybrids unter den Bedingungen einer Nick-Translation durch DNA ersetzt. Die Ausbeuten für die Zweitstrangsynthese schwankten zwischen 75% und 90%, in bezug auf die Menge an eingesetztem RNA/cDNA-Hybrid. Die Längenverteilung der während der Synthese des ersten Stranges bzw. des zweiten Stranges radioaktiv markierten cDNAs wurde auf 3-6%igen denaturierenden Harnstoff-PAA-Gelen verfolgt. Die Autoradiographie in Abb. 2 zeigt die typische Längenverteilung der erhaltenen cDNAs (Spur 1 nach Synthese des ersten Stranges; Spur 2 nach Synthese des zweiten Stranges). Ihr Hauptanteil hatte eine Länge >800nt. Intensitätsunterschiede zwischen den gezeigten Gelbahnen sind auf die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der Proben zurückzuführen.

Erreichte das Längenspektrum der synthetisierten ss cDNAs nicht mehr als max. 1000nt, wurde die cDNA-Synthese nach dem ersten Schritt abgebrochen. Die Ursache für die Synthese ausschließlich kurzer ss cDNAs kann eine zu hohe Salzkonzentration im Ansatz (s. 3.1.2.) oder teilweise degradierte RNA sein.

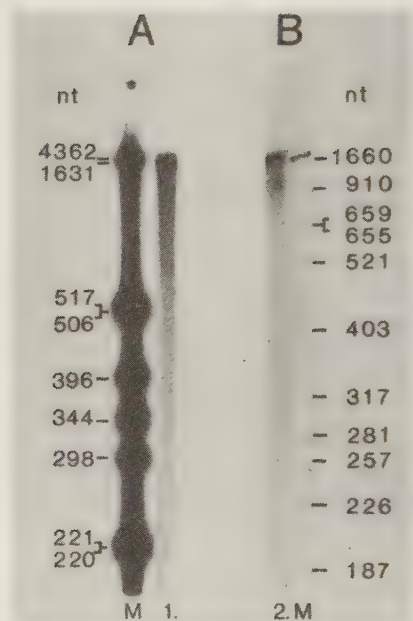


Abb. 2:

Synthese einzel- und doppelsträngiger cDNA mit M-MLV Reverser Transkriptase bzw. DNA-Polymerase I.

Einzelsträngige (A, Spur 1.) bzw. doppelsträngige cDNA (B, Spur 2) wurde auf PAA-Gelen, die 8M Harnstoff enthielten, aufgetrennt und autoradiographiert.

A: HeLa-poly(A⁺)-RNA (10µg) wurde unter Zusatz von 30µCi α -³²P-dATP (spez. Akt. 3000Ci/mmol) nach 2.3.2. revers transkribiert. Zur Überprüfung der Längenverteilung der erhaltenen cDNAs wurde 1/10 des Ansatzes auf einem 3%igen PAA-Gel aufgetrennt.

B: Doppelsträngige cDNA wurde aus 2µg HeLa-poly(A⁺)-RNA nach 2.3.2. und 2.3.3. synthetisiert, wobei die zur Markierung erforderliche Radioaktivität (50µCi mit einer spez. Akt. von 800Ci/mmol) erst zur Synthese des zweiten Stranges zugegeben wurde. Zur Längenbestimmung wurde 1/10 des Ansatzes auf einem 4%igen PAA-Gel aufgetrennt. M bezeichnet die Spuren der Längensstandards, die identisch mit den in Abb.1 gezeigten sind. Die Zahlen geben die Fragmentlängen in Nukleotiden an.

Die Längenverteilung der cDNAs >900nt kann nur in denaturierenden Agarosegelen überprüft werden, da auch niederprozentige PAA-Gele diesen Molekularbereich nicht mehr ausreichend auftrennen. Abb. 3 macht deutlich, daß ein großer Anteil der cDNAs bis zu 2000nt lang ist. Die durchschnittliche Länge der cDNAs nahm nach der Synthese des zweiten cDNA-Stranges nicht zu (Abb. 3, Spur 2), so daß die Entstehung von Haarnadelstrukturen nahezu ausgeschlossen werden kann [47]. Die Zunahme an kürzeren cDNAs war untypisch und in diesem Fall vermutlich auf eine zu geringe Aktivität der *E. coli*-Ligase während der Synthese des zweiten Stranges zurückzuführen.

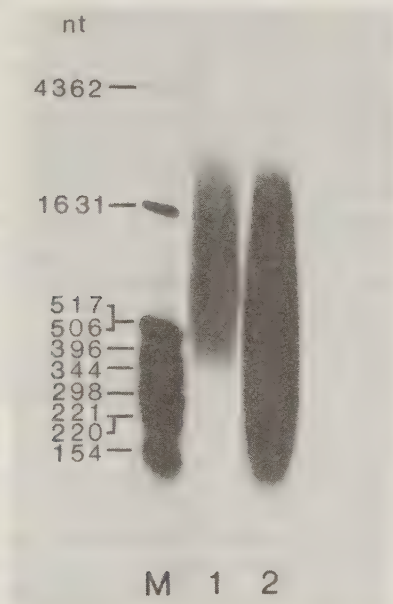


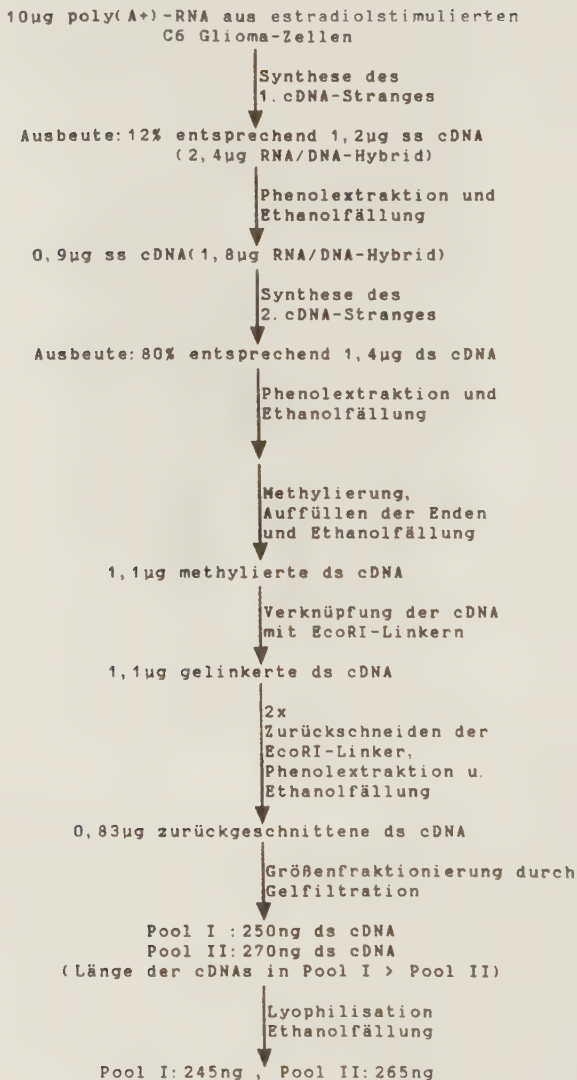
Abb. 3:

Auftrennung der einzel- und doppelsträngigen cDNA in einem alkalischen Agarosegel.

HeLa-poly(A⁺)-RNA (10µg) wurde zur Synthese einzelsträngiger cDNA mit M-MLV Reverser Transkriptase wie in 2.3.2. angegeben inkubiert. Zur Markierung der erhaltenen cDNA wurden 40µCi α-³²P-dATP (spez. Akt. 800Ci/mmol) zugesetzt. Zur Kontrolle wurde 1/20 des Ansatzes in einem 1%igen, alkalischen Agarosegel aufgetrennt und autoradiographiert (Spur 1). In einem identischen Parallelansatz wurde doppelsträngige cDNA hergestellt (s. 2.3.3.), dem erst zur Synthese des zweiten Stranges die gleiche Menge an Radioaktivität zugesetzt worden war. In Spur 2 wurde 1/10 dieses Ansatzes aufgetrennt. Als Längenstandard wurden ³²P-endmarkierte Fragmente einer pBR322/RinfI- und einer pBR322/EcoRI-Verdauung aufgetragen (Spur M) [121]. Die Zahlen geben die Längen in Nukleotiden an.

Abb. 4:

Flußdiagramm der cDNA-Synthese



Nachdem die Erst- und Zweitstrangsynthese der cDNA durch Testreaktionen mit HeLa-poly(A⁺)-RNA überprüft und optimiert worden waren, wurden 10µg poly(A⁺)-RNA aus Ratten-C6 Glioma-Zellen unter den in 2.3. angegebenen Bedingungen zur Herstellung der cDNA-Bibliothek eingesetzt. Dem Ansatz zur Synthese des ersten cDNA-Stranges wurden 40µCi (spez. Akt. 800Ci/mmol) α -³²P-dATP zugesetzt. Die dadurch erzielte geringe radioaktive Markierung der cDNA ermöglichte eine Ausbeutebestimmung und Überprüfung der einzelnen Syntheseschritte. Die Ausbeuten und der Verlauf der Synthese sind im Flußdiagramm Abb. 4 dargestellt.

3.1.4. Modifizierung der ds cDNA für die Klonierung

Zur Klonierung sollte die ds cDNA mit synthetischen EcoRI-Linkern (s. 2.3.5.) versehen werden. Vor der Ligation der ds cDNA mit der Vektor-DNA mußten diese Linker zur Generierung von kohäsiven Enden mit EcoRI geschnitten werden. Um die internen EcoRI-Schnittstellen der cDNA zu schützen, wurde diese mit EcoRI-Methylase behandelt. Bei der Methylierung katalysiert die EcoRI-Methylase den Transfer einer Methylgruppe des S-Adenosylmethionins auf den mit einem * gekennzeichneten Adeninrest innerhalb der EcoRI-Erkennungssequenz 5'-GAA*TTC-3' [103].

Die Methylierungsreaktion wurde in einer "Eintopfreaktion" mit der Auffüllreaktion kombiniert (s. 2.3.4.). Diese Reaktion wurde mit DNA-Polymerase I aus *E. coli* durchgeführt und sollte durch exonukleolytisches Entfernen der 3'-überhängenden Enden bzw. Auffüllen der 5'-überhängenden Enden den Anteil der ds cDNAs mit stumpfen Enden erhöhen [104], welche dann durch T4 DNA-Ligase mit den EcoRI-Linkern verknüpft werden konnten.

Die synthetischen Linker trugen freie 5' OH-Enden, so daß sie vor einer Ligation mit der ds cDNA phosphoryliert werden mußten (s. 2.3.5.). Die EcoRI-Linker wurden mit einem Überschuß an ATP unter Zusatz von γ -³²P-ATP 4h kinasiert. Ein Aliquot des Ansatzes wurde entnommen und zur Kontrolle der Phosphorylierungsreaktion, der T4 DNA-Ligase- und der EcoRI-Endonuklease-Aktivität, wie in Abb. 5 angegeben, behandelt.

Wurde in der Autoradiographie (Abb. 5) mehr als ein Phosphorylierungsprodukt sichtbar, so wurden die Linker verworfen. Durch die Verknüpfung der Linker mit sich selbst und dem anschließenden Zurückschneiden wurde die Aktivität der entsprechenden Enzyme und ihre Substratspezifität in bezug auf die Linker überprüft.

Ein 50facher, molarer Überschuß an Linkern hatte sich in Vorexperimenten als ausreichend erwiesen, um die gesamte cDNA eines Ansatzes mit Linkern zu versehen. Höhere Überschüsse an Linkern ließen sich sehr schlecht quantitativ zurückschneiden und entfernen.

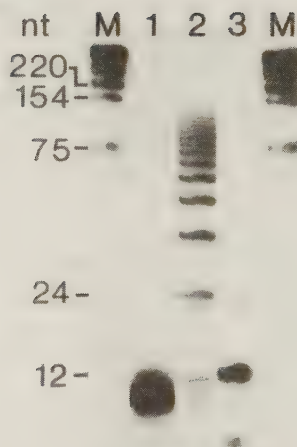


Abb. 5:

Kontrollversuche mit EcoRI-Linkern

Die 5'-OH-Enden der EcoRI-Linker mußten vor ihrer Verknüpfung mit der ds cDNA kinasiert werden (s. 2.3.5.). Zur Kontrolle der Phosphorylierung wurden der Reaktion 10µCi γ - 32 P-ATP (spez. Akt. 6000Ci/mmol) zugesetzt und ein Aliquot (1µl) eines 20µl Ansatzes auf einem 18%igen 8M Harnstoff-PAA-Gel analysiert (Spur 1). Ein weiteres Aliquot (2µl) der phosphorylierten Linker wurde in einem Volumen von 10µl ligiert (s. 2.3.6.). Die nach 30min entstandenen Linkeroligomere wurden durch die Auftrennung von 7µl des Ligationsansatzes auf demselben Gel (Spur 2) überprüft. Die übrigen 3µl aus der Ligationsreaktion wurden vor der Auftragung auf das Gel mit EcoRI (s. 2.17.1.) geschnitten (Spur 3). Die Zahlen neben der gezeigten Autoradiographie geben die Längen in Nukleotiden an (Spur M=Längenstandard).

3.1.5. Abtrennen überschüssiger Linker und Größenfraktionierung der ds cDNA

Die Verknüpfung von Linkern mit der Vektor-DNA würde zu "unechten" Rekombinanten in der cDNA-Bibliothek führen. Deshalb müssen überschüssige Linker vor dem Klonierungsschritt quantitativ von der cDNA abgetrennt werden. Besonders wichtig ist

dies auch, weil sich kurze DNA-Fragmente (<200bp) erfahrungsgemäß effizienter mit der Vektor-DNA ligieren lassen als längere (105). Aus dem gleichen Grund ist es sinnvoll, vor der cDNA/Vektor-Ligation, eine Größenselektionierung der cDNAs vorzunehmen. Die mit den cDNAs kovalent verbundenen Linkeroligomere wurden, um eine vollständige Verdauung zu erreichen, zweimal mit EcoRI geschnitten. Zwischen den Verdauungen sowie danach wurde die cDNA aus 2M Ammoniumacetat präzipitiert. Bei einer Ammoniumacetat-Fällung verbleibt der größte Teil der überschüssigen Linker im Ethanolüberstand und kann dekantiert werden (s. Abb. 6A, Spur Ü). Die cDNA im Pellet, in der sich nur noch ein geringer Anteil an überschüssigen Linkern befand, wurde durch eine Gelfiltration in einer Biogel A50m-Säule größenfraktioniert (s. 2.3.8.).

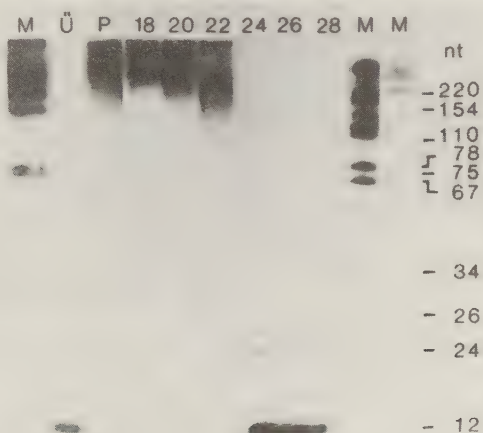


Abb. 6A:

Längenfraktionierung der Ratten-cDNA

Mit EcoRI-Linkern versehene cDNA wurde zurückgeschnitten und durch Gelfiltration in einer Biogel A50m-Säule von überschüssigen Linkern abgetrennt sowie gleichzeitig größenfraktioniert. Aliquote Teile von 1000cpm/Fraktion wurden aus ausgewählten Fraktionen entnommen und auf einem 18%igen 8M Harnstoff-PAA-Gel aufgetrennt. Die Zahlen über den Gelspuren geben die betreffende Fraktion an. Zum Vergleich wurden vor der Auftragung auf die Biogel-Säule 4000cpm des cDNA-Pellets (P) und 2000cpm des EtOH-Überstandes (Ü) der NH₄Ac-Fällung (s. 2.3.7.) entnommen und in demselben Gel aufgetrennt. Die mit M bezeichneten Spuren enthalten ³²P-endmarkierte Restriktionsfragmente einer pBR322/HinfI- und einer pYPI/II / HpaII-Verdauung als Längenstandard. Die Längen der Fragmente sind in Nukleotiden angegeben.

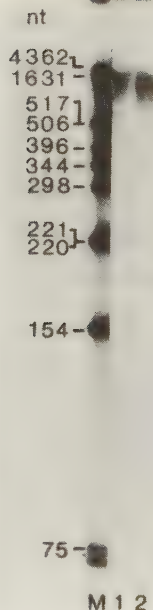


Abb. 6B:

Überprüfung der Längenfractionierung

Nach der Gelfiltration (s. 2.3.8.) wurden die Fraktionen 10-15 sowie 16-20 in zwei Pools vereinigt. Beide Pools sollten cDNAs der Längen ≥ 500 bp enthalten. Zur Überprüfung ihrer Längenverteilung wurden je 1000cpm der vereinigten Fraktionen 10-15 (Spur 1) und 16-20 (Spur 2) in einem 6%igen 8M Harnstoff-PAA-Gel aufgetrennt und autoradiographiert. M: Längenstandard wie in Abb. 3.

Die Biogelsäule wurde durch Auftrennung von endmarkierten pBR322/HinfI- und pBR322/EcoRI-Fragmenten sowie endmarkierten Linkern standardisiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf 4-6%igen denaturierenden PAA-Gelen überprüft und der Fluß der Säule so eingestellt, daß die Linker vollständig von dem 154nt langen pBR322/HinfI-Fragment abgetrennt werden konnten. Gleichzeitig war dann die gewünschte Größenfraktionierung möglich. Ein Fluß von 1 Tropfen/4min war dazu ausreichend.

Um eine Kontamination der cDNA mit der Plasmid-DNA zu vermeiden, wurde vor jedem Säulenlauf mit cDNA der Säulenkörper gereinigt und mit einer neuen Gelmatrix gleichen Volumens gefüllt. Das Gel wurde mit ca. 20 Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert. Alle Auffanggefäße und der Säulenkörper wurden vor der Benutzung silanisiert, um Verluste zu reduzieren, die ohne diese Behandlung bei 30% der aufgegebenen DNA-Menge lagen.

Für die cDNA aus Ratten-C6 Glioma-RNA wurden über 90% der aufgegebenen Radioaktivität im Säuleneluat wiedergefunden. Die

erhaltenen Fraktionen wurden in zwei Pools vereinigt. Pool I enthielt die längeren cDNAs (Fraktionen 10-15), Pool II die etwas später eluierenden, kürzeren cDNAs (Fraktionen 16-20). Die cDNAs beider Pools hatten Längen ≥ 500 nt (s. Abb. 6B) und waren frei von Linker-DNA (s. Abb. 6A).

Die Alternative zur Säulenchromatographie wäre eine Größenselektion in einem niedrigschmelzenden Agarosegel gewesen [106]. Bedingt durch den großen, molaren Überschuß der Linker, hätte man die ausgeschnittene cDNA zur vollständigen Entfernung der Linker nochmals über ein zweites Gel reinigen müssen. Der dazu erforderliche Zeitaufwand und die entstehenden Ausbeuteverluste wären größer als bei der Gelfiltration gewesen.

3.1.6. Klonierung der cDNA

Als Klonierungsvektor aus Ratten-C6 Glioma-Zellen wurde λ gt10 [47] benutzt. Dieser Vektor hat eine Länge von 43,34kb und kann mit insertierten cDNAs einer Länge von bis zu 7,6kb (entsprechend 105% der Lambda-Wildtypgröße [46, 107]) verpackt werden.

Die Verwendung von Phagen-DNA hat gegenüber Plasmid-DNA zwei große Vorteile:

1. Die erreichbaren Klonierungseffizienzen sind durch die in vitro-Verpackung der DNA höher.

2. Die Handhabung der cDNA-Bibliothek (Filterabzüge und Lagerung) wird einfacher.

Die cDNA wird in eine singuläre EcoRI-Schnittstelle innerhalb des Phagen-Repressorgens cI einkloniert [108], das durch die Insertion zerstört wird. Rekombinante Phagen sind also cI⁻ und können durch ihre Plaquemorphologie auf E. coli C600 von nicht rekombinanten Phagen cI⁺ unterschieden werden. Durch die Verwendung von hfl-Bakterienstämmen können Plaques nicht rekombinanter Phagen vollständig unterdrückt werden.

Das zur in vitro-Verpackung der rekombinanten Phagen-DNA erforderliche Verpackungslysatz wurde nach 2.2.1. bzw. 2.2.2. hergestellt und getestet. Die für die Vorversuche benötigte λ gt10-DNA wurde nach der in 2.5.1. angegebenen Methode isoliert. Aus 1l Lysatz wurden dabei 1,1mg λ gt10-DNA gewonnen.

Die Verpackungseffizienz wurde für λ gt10-DNA bestimmt und betrug 5×10^7 pfu/ μ g, wobei in einem Ansatz (s. 2.2.2.) max. 0,5 μ g DNA verpackt werden konnten. Die endogene DNA des Verpackungs-extraktes war vollständig geschert, da sie in Kontrollansätzen ohne λ gt10-DNA keinen Hintergrund erzeugte. Für die Klonierung der cDNA aus Ratten-C6 Glioma-poly(A⁺)-RNA wurde EcoRI-geschnittene, dephosphorylierte λ gt10-DNA käuflich erworben (Promega, Heidelberg). Diese DNA lieferte nach in vitro-Verpackung einen Hintergrund von 450pfu/ μ g auf C600. Die cos-Stelle dieser DNA war ligiert worden, um durch die Klonierung konkatemere DNA-Moleküle zu erzeugen. Die cDNA wurde in zwei Ansätzen (Pool I: 245ng ;

Pool II: 265ng) wie in 2.3.10. angegeben mit der Vektor-DNA verknüpft und getrennt in vitro verpackt (s. 2.3.11.). Aliquote Teile der Verpackungsansätze wurden zur Bestimmung des Phagentiters auf E. coli C600 und Y1073 ausplattiert. In einem Parallelansatz wurde in vitro verpackte λ gt10-DNA zur Kontrolle der Verpackungseffizienz und der hfl-Selektion ausplattiert. Die cDNA aus Pool I ergab 550000 unabhängige Klone. Die Verpackungseffizienz betrug $2,5 \times 10^6$ pfu/ μ g cDNA und 90% der erhaltenen Phagen waren rekombinant. Die cDNA aus Pool II lieferte zusätzlich 150000 Klone, die aber im weiteren nicht näher untersucht wurden. Beide cDNA-Bibliotheken wurden anschließend in dem hfl-Bakterienstamm Y1073 amplifiziert (s. 2.3.11.).

3.2. Isolierung von cDNA-Klonen estradiolstimulierbarer Transkripte

Zur näheren Charakterisierung der estradiolstimulierbaren Transkripte E1 und E2 [38] mußten längere cDNA-Klone aus der erstellten λ gt10-Bibliothek isoliert werden. Als Hybridisierungssonden dienten die Klone pE1 und pE2 (s. 3.1.), die keinen durchgehenden Leserahmen besaßen und vermutlich [38] aus dem nicht translatierten 3'-Bereich der Transkripte stammten.

a) Zur Hybridisierung mit pE1 wurden 540000 Rekombinanten der λ gt10-Bank (Titer der amplifizierten Bibliothek: $3,5 \times 10^7$ Phagen/ μ l) auf 18 Replika-Filtern abgezogen (s. 2.4.) und mit der nick-translatierten pE1-Probe hybridisiert (s. 2.4.2.). Durchschnittlich wurden 50 Signale pro Filter (30000 Rekombinanten) erhalten. Das bedeutet, daß die E1-cDNAs einen 0,2%igen Anteil an der gesamten cDNA-Population haben und damit ein relativ häufiges Transkript repräsentieren [51]. Plaques positiver Phagen wurden eluiert, zur Vereinzelung erneut ausplattiert und hybridisiert. Zehn positive Phagen wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Die DNA dieser Phagen wurde aus kleinen Lysaten (s. 2.5.2.) isoliert und die Länge der insertierten cDNAs auf einem Agarosegel bestimmt (s. Abb. 7). Die DNA aus diesem Gel wurde auf Nylonmembranen übertragen (s. 2.14.) und erneut gegen pE1 hybridisiert. In der Autoradiographie Abb. 7B sind diese Klone gezeigt. Nur die längsten cDNAs der Klone 3e* (≈ 1000 bp) und 3c (≈ 920 bp) wurden anschließend genauer untersucht.

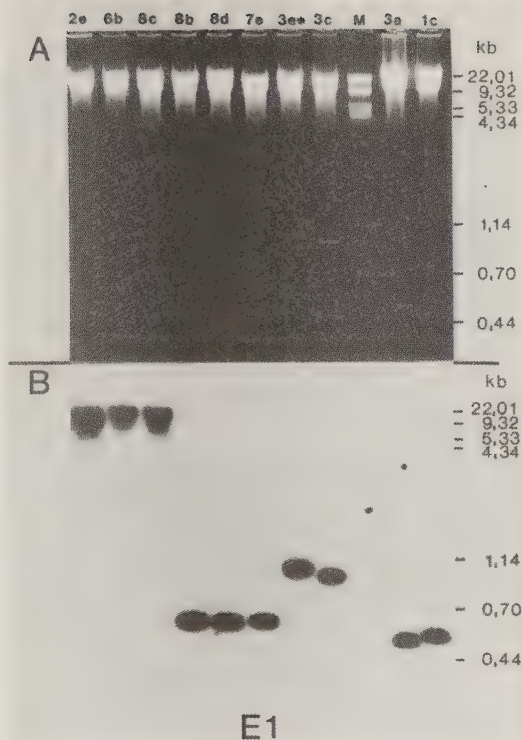


Abb. 7:

Längenbestimmung und Southernanalyse einiger Lambda-E1-Klone
Die DNA einiger mit pE1 hybridisierender Phagen aus der λ gt10-cDNA-Bibliothek wurde aus kleinen Lysaten (s. 2.5.2.) isoliert und mit EcoRI geschnitten.

A: Zur Längenbestimmung der insertierten cDNAs wurden die restringierten Phagen-DNAs auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandard (M) wurde BglII/HindIII-verdaute λ gt10-DNA benutzt. Die Längen der entstandenen Fragmente (in kb) sind auf der rechten Seite des Gels angegeben.

B: Die DNA aus dem Agarosegel (A) wurde auf Nylonfilter transferiert (s. 2.14.) und zur Kontrolle mit 2×10^6 cpm/ml nick-translatierter pE1-DNA (spez. Akt. $3,6 \times 10^7$ cpm/ μ g Plasmid-DNA) hybridisiert (s. 2.15.1.). Die Autoradiographie wurde 24h bei -70°C mit Verstärkerfolie durchgeführt. Die Bezeichnungen der Klone sind über den Gelspuren angegeben.

b) Zur Isolierung eines vollständigen cDNA-Klons für das Transkript E2 wurden 600000 Rekombinanten der λ gt10-Bibliothek auf 20 Replika-Filtern ausplattiert und mit der ^{32}P -markierten, linearisierten pE2-Probe hybridisiert (Markierung nach 2.8.3.).

Es wurden insgesamt 100 positive Klone gefunden. Somit sollte das E2-Transkript wesentlich seltener als das E1-Transkript in der Zelle vorkommen (E1:E2=10:1). Die DNA zufällig ausgewählter, positiver Phagen wurde nach Vereinzelung und erneuter Hybridisierung auf Agarosegelen untersucht und auf Nylonmembranen transferiert. Einige der cDNAs (s. Abb.8I/II/III) wurden im Agarosegel in zwei Banden aufgespalten. Ob sie eine interne EcoRI-Schnittstelle, die durch EcoRI-Linker künstlich eingeführt wurde, enthielten, oder ob es sich nur um die Verunreinigung durch einen zweiten Phagen handelte, wurde nicht untersucht. Eine EcoRI-Schnittstelle innerhalb der E2-cDNA-Sequenz war, wie sich später durch die Sequenzierung herausstellte (s. 3.4.3.), nicht vorhanden. Von den übrigen hybridisierenden cDNAs wurden die längsten (20e, 12c, 9a, 3e; s. Abb.8, 9, 10) im weiteren subkloniert und sequenziert.

Bei ca. 30-40% der gefundenen E1- und E2-Klone läßt sich die insertierte cDNA mit EcoRI nicht mehr ausschneiden, so daß jeweils ein Vektorarm hybridisiert (s. Abb.7 u. 8). Durch eine BglII/HindIII-Verdauung können diese cDNAs dennoch isoliert werden, enthalten dann aber insgesamt 1,14kb Vektor-DNA.

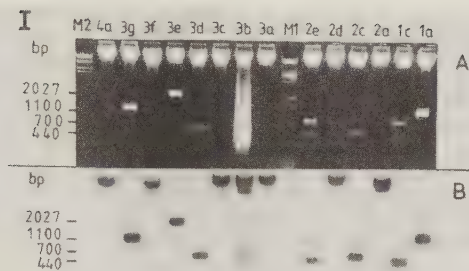
Alle gefundenen cDNA-Klone haben Längen >500bp. Kürzere cDNAs und Linker sind durch die Größenfraktionierung (s. 3.1.5.) quantitativ abgetrennt worden.

Abb.8 (s. folgende Seite):

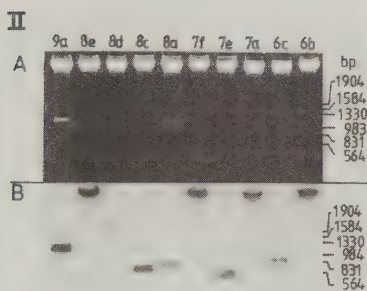
Längenbestimmung und Southern-Analyse einiger Lambda-E2-Klone

Nach der Plaquehybridisierung (s. 3.2.) wurden positive Phagen aus der λ gt10-cDNA-Bibliothek in Minipräparationen (s. 2.5.2.) vermehrt. Die Phagen-DNA wurde isoliert, zur Längenbestimmung der enthaltenen cDNAs mit EcoRI geschnitten und auf 1%igen Agarosegelen fraktioniert (Teil I, II, III jeweils A). Als Längenstandard wurde EcoRI/HindIII-verdaute λ ci 857Sam7-DNA (123) (M1) sowie BglII/HindIII-verdaute λ gt10-DNA (M2) benutzt. Die Längen sind seitlich der Gele in Basenpaaren angegeben. Über den Gelspuren befinden sich die Bezeichnungen der entsprechenden Klone. Die DNA aus den Agarosegelen wurde auf Nylonmembranen übertragen (s. 2.14.), fixiert und mit 2×10^6 cpm/ml ^{32}P -markierter pE2-DNA (spez. Akt. 3×10^8 cpm/ μ g) hybridisiert. Die entsprechenden Autoradiographien sind unterhalb der Gele abgebildet (Teil I, II, III jeweils B) und wurden 24h bei -70°C belichtet.

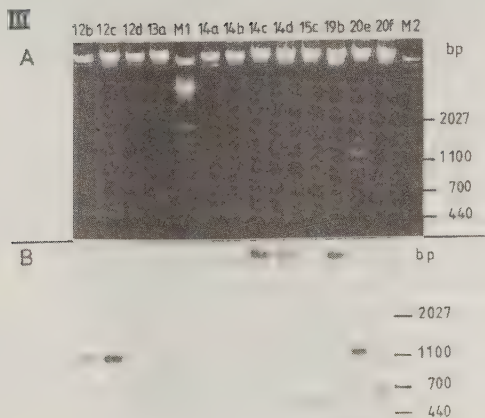
Abb. 8 (Legende s. S. 40)



E2



E2



E2

3.3. Charakterisierung der E1-cDNA-Klone

3.3.1. Restriktionsanalyse

Die aus der λ gt10-Bibliothek isolierten cDNAs (3c, 3e*) wurden in die EcoRI-Schnittstelle des Plasmids pAT153 [55] subkloniert, da sich Plasmid-DNA schneller und mit höheren Ausbeuten isolieren läßt.

Beide pAT/cDNA-Klone wurden anschließend mit den gleichen Restriktionsendonukleasen (s. Abb. 9) geschnitten und zeigten nach Fraktionierung in 1%igen Agarosegelen das gleiche Spaltmuster. Alle verwendeten Enzyme hatten zur Vereinfachung der Auswertung in der Vektor-DNA entweder keine oder nur eine Schnittstelle. Ausnahmen bildeten lediglich TaqI mit 7 und HincII mit 2 Schnittstellen in der Vektor-DNA.

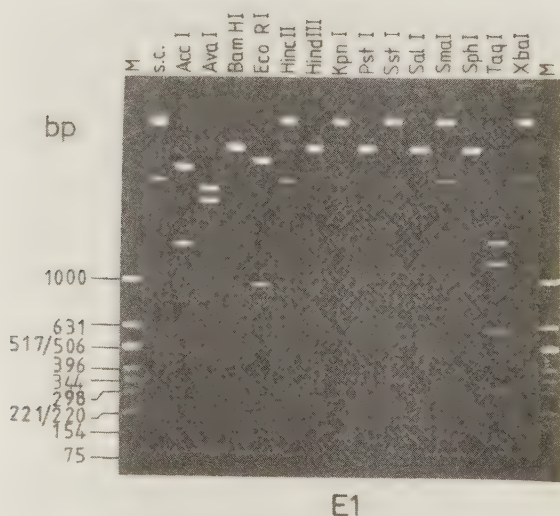


Abb. 9:

Restriktionsanalyse des E1-Klons pAT/3c

Plasmid-DNA des Klons pAT/3c wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die zur Verdauung benutzten Endonukleasen sind oberhalb der Gel-spuren angegeben. Die mit s.c. bezeichnete Spur enthielt ungeschnittene (supercoiled) pAT/3c-DNA. Als Längenstandard (M) wurden Fragmente einer EcoRI/HinfI-Doppelverdauung des Plasmids pBR322 aufgetragen. Die Längen sind in Basenpaaren (bp) angegeben. - Nur die Enzyme AccI und AvaI haben Schnittstellen innerhalb dieser cDNA. Das Spaltmuster von TaqI ist zu komplex, um Schnittstellen innerhalb der cDNA oder der Vektor-DNA unterscheiden zu können. HincII, das zwei Erkennungsstellen innerhalb der Vektor-DNA hat, war inaktiv. Durch EcoRI wird die gesamte 3c-cDNA (Länge $\approx$ 920bp) aus der Vektor-DNA herausgeschnitten.

Da durch die EcoRI-Verdauung jeweils die vollständige cDNA aus dem Vektor herausgeschnitten wurde, konnten nach der Agarosegel-Elektrophorese die erhaltenen Fragmentlängen bestimmt werden. Für Klon 3c ergab sich eine Länge von ≈ 920 bp (s. Abb. 9), für 3e* eine Länge von ≈ 1000 bp (s. Abb. 10). Weil es sich scheinbar um identische cDNAs handelte, wurde nur die längere (3e*) weiter untersucht.

Größere Mengen der pAT/3e*-DNA wurden isoliert (s. 2.7.1.) und zur Fragmentisolierung (s. 2.6.2.) mit EcoRI verdaut. Die durch ein niedrigschmelzendes Agarosegel erhaltene 3e*-cDNA wurde mit den in Abb. 10 angegebenen Endonukleasen restringiert, um weitere Schnittstellen zu finden, die für eine Sequenzierung dieses Fragments ausgenutzt werden konnten. Erwartungsgemäß schnitten einige Enzyme, die eine 4bp-Erkennungssequenz besitzen, während außer den bekannten AccI/AvaI-Restriktionsstellen keine weiteren für Enzyme mit einer 6bp-Erkennungssequenz gefunden wurden.

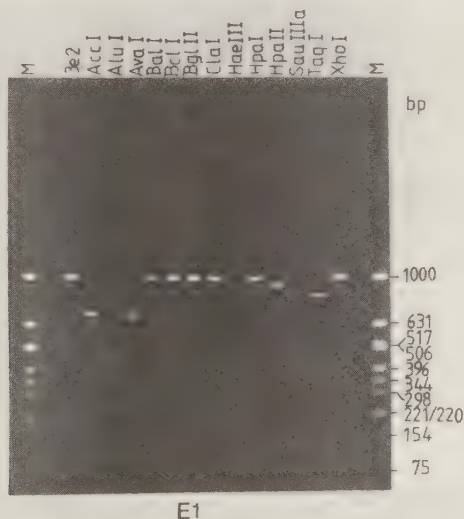


Abb. 10:

Restriktionsanalyse des 3e*-cDNA-Klons

Das cDNA-Fragment 3e* wurde mit den über den Gelspuren angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Der Längenstandard (M) entspricht dem in Abb. 9.

Die Anordnung der Restriktionsfragmente innerhalb der cDNA 3e* wurde durch die (totale und partielle) Verdauung von mit 32 P einseitig endmarkierten Fragmenten erhalten, die auf 6%igen denaturierenden PAA-Gelen aufgetrennt und autoradiographiert wurden. Dabei ließ sich für die HpaII-Verdauung kein endmarkiertes Fragment in der Autoradiographie nachweisen. Eine HpaII-Schnittstelle ist, wie auch durch die Sequenzierung

(s. 3.3.2.) gezeigt wurde, in der 3e*-cDNA nicht vorhanden. Vermutlich wurden die Enden des cDNA-Fragments durch eine Nuklease-kontamination während der Verdauung exonukleolytisch abgespalten (vgl. a. Abb.10).

Die aus den obigen Versuchen resultierende Restriktionskarte ist in Abb.11 gezeigt und wurde durch einige im Verlauf der Sequenzierung gefundene Schnittstellen (PvuII, StyI, XmaIII) ergänzt. Die von M. Vlahova [38] postulierte SmaI-Schnittstelle wurde weder in pE1 noch in der 3e*-cDNA, die die pE1-Sequenz vollständig enthält, gefunden.

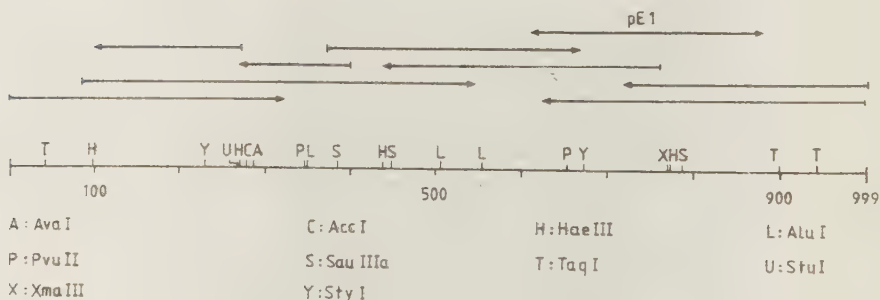


Abb. 11:

Restriktionskarte der 3e*-cDNA

Die gesamte Länge des E1-Transkriptes beträgt $\approx 1,6$ kb [38]; der Klon 3e* deckt etwas weniger als 2/3 dieser Sequenz ab. Die Zahlen der Skala beziehen sich auf Längen in Basenpaaren. Die Großbuchstaben markieren die Schnittstellen der angegebenen Enzyme. Die Pfeile oberhalb der Restriktionskarte zeigen die Richtung und die sequenzierten Längen der Subklone in M13 mp18/19-Phagen an. Der in beiden Richtungen sequenzierte Klon pE1 [38] ist gesondert bezeichnet.

3.3.2. Sequenzierung der E1-Subklone

Die ≈ 1 kb lange 3e*-cDNA wurde in beiden Orientierungen in die Phagen M13 mp18 und M13 mp19 subkloniert, um die Isolierung einzelsträngiger DNA, die für die Sequenzierung nach Sanger *et al.* [74] benutzt werden sollte, zu ermöglichen. Da nur kürzere

Fragmente (≤ 350 bp) auf einem Gel durchgehend sequenziert werden können, mußte die 3e*-cDNA zusätzlich in kleinere Stücke zerlegt und subkloniert werden. Von den innerhalb der 3e*-cDNA mehrfach schneidenden Enzymen (AluI, TaqI, HaeIII, SauIIa) lieferte nur HaeIII Fragmente in adäquaten Längen, die aus einem niedrig-schmelzenden Agarosegel (s. 2.6.2.) isoliert wurden. Die fünf Fragmente, von denen zwei ungefähr die gleiche Länge besaßen (≈ 260 bp, s. Abb.12), wurden in die SmaI-Schnittstelle des Phagen M13 mp18 einkloniert.

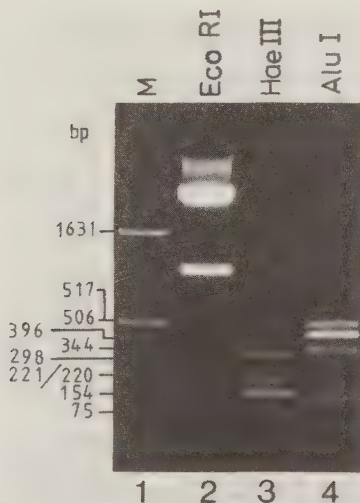


Abb. 12:

Isolierung von E1-cDNA-Fragmenten

Zur Subklonierung in die Phagen M13 mp18 und M13 mp19 wurde pAT/3e*-DNA mit EcoRI verdaut (Spur 2) bzw. 3e*-cDNA mit HaeIII (Spur 3). Die 3e*-cDNA und alle HaeIII-Fragmente wurden extrahiert (s. 2.6.2.) und wie angegeben subkloniert (s. 2.10. u. 3.3.2.). Spur 4 zeigt eine partielle Restriktion der 3e*-cDNA mit AluI. Als Längenstandard M dienten Fragmente einer pBR322/HinfI-Verdauung (Spur 1).

Ein zusätzlicher Subklon wurde durch die Deletion eines 286bp langen SmaI/StuI-Fragmentes aus dem Phagen 3e*/M13 mp18 erzeugt.

Alle M13-Subklone wurden überlappend und mehrfach in der in Abb.11 angezeigten Richtung und Länge sequenziert. In Abb.13 ist die erhaltene E1-Teilsequenz der cDNA 3e* dargestellt.

```

CACTACTCTCCTACAGACCGAAATCTAAATACTACTTTCTTCGACCCCGCTGGAGGTGG 60
T M L L T D R N L N T T F F D P A G G G 20

AGACCCAATTCTCTATCAACACCTATTCTGATTCTTCGGCCACCCAGAAGTGATCATCTT 120
D P I L Y Q H L F W F F G H P E V Y I L 40

AATTCTTCAGGGTTTGGAAATTATTTACATGTAGTTACCTATTACTCTGGAAAAAAGA 180
I L P G F G I I S H V V T Y Y S G K K E 60

ACCTTCGGATATATAGGTATGGTATGAGCCATAATATCTATTGGCTTCTAGGGTTTAT 240
P F G Y M G M V W A M M S I G F L G F I 80

TGTATGAGCACATCATATTCACAGTAGGCCATAGATGTAGACACCCGAGCCTACTTTAC 300
V W A H H M F T V G L D V D T R A Y F T 100

ATCTGCCACTATAAATTATCGCAATTCCTACAGGCGTAAAGTATTACAGCTGACTCGCTAC 360
S A T M I I A I P T G V K V F S W L A T 120

ACTACATGGAGGGAATATCAAATGATCCCCGCCATATTATGAGCCTTAGGGTTTATCTT 420
L H G G N I K W S P A M L W A L G F I F 140

CTTATTACAGTAGGGGGCCTAACAGGGATCGTACTATCTAACTCATCCCTTGACATTGT 480
L F T V G G L T G I V L S N S S L D I V 160

ACTTCATGATACATACTATGTAGTAGCTCACTTCCACTATGTCTTATCTATAGGAGCAGT 540
L H D T Y Y V V A H F H Y V L S M G A V 180

ATTCGCCATCATAGCTGGCTTCGTCCACTGATTCCCACTATTCTCAGGCTATACCTAAA 600
F A I M A G F V H W F P L F S G Y T L N 200

TGACATGAGCAAAAGCCCACTTTGCCATTATTTGTAGGTGTAAACATAACATTTTT 660
D T A K A H F A I M F V G V N M T F F 220

CCCTCAACACTTCCTAGGATTAGCGGGGATACCTCGTCGTTACTCTGATTATCCAGATGC 720
P Q H F L G L A G M P R R Y S D Y P D A 240

TTACACCACATGAAATACAGTCTCCTCTATAGGCTCATTATCTCACTTACGGCCGCTCT 780
Y T T N T V S S M G S F I S L T A V L 260

TGTAAATGATCTTCATGATTTGAGAAGCCTTCGCATCAAAACGAGAAGTACTCTCAATTC 840
V M I F M I W E A F A S K R E V L S I 280

CTACTCCTCAACTAACCTAGAATGACTGCATGGATGCCCCCACCCTACCACACATTGCA 900
Y S S T N L E W L H G C P P P Y H T F E 300

AGAACCTTCCTACGTAAGTAAATAAGAAAGGAAGGATTGCAACCCCTACAACCTGGT 960
E P S Y V K V K 308

TTCAAGCCAATTTTATAACCATATGTCTTTCTCGTAT - 999

```

Abb. 13

Nukleotidsequenz der 3e*-cDNA

Die 3e*-Nukleotidsequenz hat eine Länge von 999 Basen. Die Nukleotide sind in 5'-nach 3'-Richtung ansteigend durchnumeriert. Die Aminosäuresequenz (im Einbuchstabencode), die aus dem längsten offenen Leserahmen abgeleitet wurde, ist unter der DNA-Sequenz angegeben und erstreckt sich von Nukleotid 2 bis zum Terminationscodon (TAA) bei Nukleotid 926. Das Initiationscodon für den gezeigten Leseraster muß bei einer Transkriptlänge von 1,6kb [38] also einige hundert Nukleotide stromaufwärts liegen (s. a. 3.3.3.). Für die Translation der 3e*-Nukleotidsequenz wurde der genetische Code der Säugermitchondrien benutzt, indem das UGA-Stoppcodon des Kerncodes Tryptophan und das AUA-Codon statt Isoleucin Methionin repräsentiert. Die gestrichelte Linie oberhalb der Nukleotidsequenz zeigt den Bereich der zu 100% homologen pE1-Sequenz [38] an.

Die in Abb.13 dargestellte Sequenz repräsentiert den codierenden DNA-Strang, der von M. Vlahova [38] bestimmt wurde. Die Transkription von E1 muß also über Nukleotid 1 in Richtung auf Nukleotid 999 verlaufen.

Die 3e*-Nukleotidsequenz wurde in alle drei möglichen Leserahmen translatiert, ohne daß ein längerer durchgehender Leseraster (längster offener Leserahmen: 459nt) gefunden wurde. Da diese cDNA aber ca. 2/3 der Transkriptlänge enthält, war es höchst unwahrscheinlich, daß sie nicht auch einen längeren Teil der translatierten Region abdeckte.

Bekanntlich wird in den Mitochondrien von Säugern bei der Translation ein abgewandelter genetischer Code benutzt [109, 110], in dem das Opal-Terminationscodon (UGA) als Tryptophan und das Iso-leucin-Triplett, AUA, als Methionin gelesen wird. Ändert man nun für die 3e*-Nukleotidsequenz den zur Translation benutzten Code in der angegebenen Weise, so daß der Mitochondrien-Code entsteht, erhält man als längsten Leseraster den in Abb.13 gezeigten. Dieser Leserahmen beginnt bei Nukleotid 2 und erstreckt sich bis zum Terminationscodon bei Nukleotid 926.

Der von M. Vlahova isolierte pE1-Klon [38] ist vollständig in der 3e*-Sequenz enthalten, 100%ig homolog und reicht von Nukleotid 611 bis Nukleotid 878 (s. gestrichelte Linie in Abb.13).

3.3.3. Identifizierung des E1-Transkriptes

Die hypothetische Proteinsequenz, die aus der 3e*-Nukleotidsequenz mit Hilfe des genetischen Codes für Säuger-Mitochondrien [109] abgeleitet worden war, kann aufgrund der bekannten Transkriptlänge (1,6kb) nur eine Teilsequenz darstellen. Setzt man voraus, daß der längste gefundene Leserahmen (s. Abb.13) auch der *in vivo* benutzte ist, muß sich das Startcodon für Methionin einige hundert Nukleotide stromaufwärts des ersten Nukleotids der 3e*-cDNA-Sequenz befinden. Die abgeleitete 3e*-Protein-Teilsequenz (308 AS) sollte also den carboxyterminalen Bereich des gesuchten Proteins repräsentieren, das wegen seiner hydrophoben Aminosäurezusammensetzung für ein Membran- oder membranassoziiertes Protein gehalten wurde.

Für die Suche nach Homologien in der MicroGenie-Datenbank wurde bewußt die Proteinsequenz eingesetzt, um die für den Datenvergleich benötigte Zeit zu reduzieren, da eine Proteinsequenz nur 1/3 der Länge der entsprechenden Nukleinsäuresequenz besitzt, die zusätzlich auch noch die nicht translatierten Bereiche enthält.

Der Vergleich mit der Protein-Datenbank enthüllte eine 97,1%ige Homologie der 3e*-Protein-Teilsequenz (AS 1 bis AS 308) mit der Untereinheit I (UE I) der Cytochrom C-Oxidase (AS 207 bis AS 514, s. Abb.14) aus Rattenleber [111], einem Enzym der Atmungskette, das integraler Bestandteil der Mitochondrienmembran ist [112] und dessen Transkriptlänge 1,6kb beträgt [110].

Von den 308 Aminosäuren, die aus der 3e*-cDNA-Sequenz abgeleitet wurden, sind 299 homolog zur Cytochrom C-Oxidase UE I und nur 9 ausgetauscht, wobei einige dieser Austausche wahrscheinlich auf Sequenzierfehler zurückzuführen sind (vgl. DNA-Homologien Abb.15).

Cytochrom C-Oxidase UE I
E1-Protein

T	M	L	L	T	D	R	N	L	N	T	T	F	F	D	P	A	G	G	G	226
D	P	I	L	Y	Q	H	L	F	W	F	F	G	H	P	E	V	Y	I	L	246
I	L	P	G	F	G	I	I	S	H	V	V	T	Y	Y	S	G	K	K	E	266
P	F	G	Y	M	G	M	V	W	A	M	M	S	I	G	F	L	G	F	I	286
V	W	A	H	H	M	F	T	V	G	L	D	V	D	T	R	A	Y	F	T	306
S	A	T	M	I	I	A	I	P	T	G	V	K	V	F	S	W	L	A	T	326
L	H	G	G	N	I	K	W	S	P	A	M	L	W	A	L	G	F	I	F	346
L	F	T	V	G	G	L	T	G	I	V	L	S	N	S	S	L	D	I	V	360
L	H	D	T	Y	Y	V	V	A	H	F	H	Y	V	L	S	M	G	A	V	386
F	A	I	M	A	G	F	V	H	W	F	P	L	F	S	G	Y	T	L	N	406
D	T	W	A	K	A	H	F	A	I	M	F	V	G	V	N	M	T	F	F	426
P	Q	H	F	L	G	L	A	G	M	P	R	R	Y	S	D	Y	P	D	A	446
Y	T	T	W	N	T	V	S	S	M	G	S	F	I	S	L	T	A	V	L	466
V	M	I	F	M	I	W	E	A	F	A	S	K	R	E	V	L	S	I	S	486
Y	S	S	T	N	L	E	W	L	H	G	C	P	P	P	Y	H	T	F	E	506
E	P	S	Y	V	K	V	K													514
																				308

Abb. 14

Homologievergleich der 3e*-Aminosäuresequenz mit der Cytochrom C-Oxidase UE I

Die aus der 3e*-cDNA abgeleitete Proteinsequenz (308 Aminosäuren (AS), s. Abb. 13) wurde mit dem C-terminalen Bereich (AS 207-AS 514) der 514 AS langen Cytochrom C-Oxidase UE I aus Ratte [111] verglichen. Nur die 3e*-Proteinsequenz ist zur besseren Übersicht durchgehend dargestellt. Nicht homologe AS der Cytochrom C-Oxidase UE I sind über der 3e*-Sequenz angegeben, alle homologen AS sind durch einen Strich markiert. Beide Proteine sind in Abständen von 20 AS durchnummeriert. Die Zahlen am rechten Rand beziehen sich auf die jeweils letzte AS einer Zeile.

Abb. 15

Ratte	Grenzen: nt 1051 - 2044
E1-Teilsequenz	Grenzen: nt 2 - 994
Maus	Grenzen: nt 5946 - 6938

```

-----C-- 1110
CACTATACTCCTTACAGACCGAAATCTAAATACTACTTTCTTCGACCCCGCTGGAGGTGG 60
-----A--A-----C--C-----C--A-----T--T-----A-- 6005

--G-----T----- 1170
AGACCCAATTCTCTATCAACACCTATTCTGATTCTTCGGCCACCCAGAAGTGATACATCTT 120
G-----C--G--T--G-----T--G-----T--T--TC- 6065

-----T-----A----- 1230
AATTCTTCCAGGGTTTGGAAATTATTCACATGTAAGTTACCTATTACTCTGGAAAAAAGA 180
T--C--C-----A-----T--C-----C----- 6125

-----A-----A----- 1290
ACCCCTTCGGATATATAGGTATGGTATGAGCCATAATATCTATTGGCTTCCTAGGGTTTAT 240
--T-----C-----A--A-----A--G-----T-----C----- 6185

-----T-----G----- 1350
TGTATGAGCACATCACATATTCACAGTAGGCCTAGATGTAGACACCCGAGCCTACTTTAC 300
-----C--C-----AT-----A-----T--G----- 6245

----- 1410
ATCTGCCACTATAAATTATCGCAATTCTACAGGCGTAAAAGTATTCAGCTGACTCGCTAC 360
--A-----C--T--C-----T-----T--A----- 6305

-----A----- 1470
ACTACATGGAGGGAATATCAAATGATCCCCGCCATATTATGAGCCTTAGGGTTTATCTT 420
C-----C-----T-----T-----T--A--T--C-----C-----T-- 6365

----- 1530
CTTATTACAGTAGGGGGCCTAACAGGGATCGTACTACTCTAACTCATCCCTTGACATTGT 480
-----T-----T--T--T-----C--A--T--TT--C-----C-- 6425

-----C----- 1590
ACTTCATGATACATACTATGTAAGTACGTCACCTCCACTATGTCTTATCTATAGGAGCAGT 540
G-----C-----C--T-----TC--A--G----- 6485

-----T----- 1650
ATTGCCCATCATAGCTGGCTTCGTCCACTGATTCCTCACTATTCTCAGGCTATACCTAAA 600
G--T--T-----A--A--T--T-----T--T-----TC-----G-- 6545

-----T----- 1710
TGACACATGAGCAAAAGCCCACTTTGCCAATTATATTTGTAGGTGTAAACATAACATTTTT 660
-----C-----C-----C-----A-----C-- 6605

```

```

T-----A----- 1770
CCCTCAACACTTCCTAGGATTAGCGGGGATACCTCGTCGTTACTCTGATTATCCAGATGC 720
-----T-----G--CC-TT-A--A-----A--A--C-----A--C--C----- 6665

---T----- 1830
TTACACCACATGAAATACAGTCTCCTCTATAGGCTCATTTCATCTCACTTACGGCCGTCCT 780
-----C--T-----T-----A-----T--T-----A--A--T--T-- 6725

-----G----- 1890
TGTAATGATCTTCATGATTGAGAAGCCTTCGCATCAAAACGAGAAGTACTCTCAATTTTC 840
CA-C-----T--A-----G-----T--T-----A--A--G--A-- 6785

-----T-----T----- 1950
CTACTCCTCAACTAACCTAGAATGACTGCATGGATGCCCCCACCCTACCACACATTGGA 900
G--TG-T-----A--TT-----T-----C-----T-----A--T----- 6845

-----T----- 2010
AGAACCTTCCTACGTAAAAGTTAAATAAGAAAGGAAGGATTGCAACCCCTACAACGTGT 960
G-----AA--T-----A-----A-----A-----A--T----- 6905

----- 2044
TTCAAGCCAATTTTCATAACCATTATGTCTTTCTC 994
-----C-----T--TA----- 6938

```

Abb. 15

Homologievergleich der E1-cDNA 3e* mit Sequenzen aus den Mitochondriengenomen der Ratte und der Maus

Die Nukleotidsequenz der 3e*-cDNA (nt1 bis nt994) wurde mit den mitochondrialen Cytochrom C-Oxidase-Genen (nt1051 bis nt2044) aus Ratte [111] sowie dem mitochondrialen Mausgenom (nt5946 bis nt6938) [113] verglichen. Nur die 3e*-cDNA-Nukleotidsequenz ist durchgehend dargestellt. Nukleotidaustausche sind für Ratte oberhalb und für Maus unterhalb der 3e*-Sequenz angegeben. Alle homologen Sequenzbereiche sind durch eine gestrichelte Linie markiert. Die Bezifferung des letzten Nukleotids jeder Zeile ist am rechten Rand für jede Sequenz angegeben. Der codierende Bereich der Cytochrom C-Oxidase UE I erstreckt sich bis einschließlich nt925 der 3e*-Sequenz. Gleichzeitig ist es das erste Nukleotid einer zum Gegenstrang der mt tRNA^{Ser} homologen Sequenz. Nukleotid 925 bis nt994 der 3e*-cDNA-Sequenz repräsentieren also den (bis auf int am 3'-Ende der cDNA) nicht codierenden Strang der mt tRNA^{Ser}.

Der im folgenden auf DNA-Ebene durchgeführte Vergleich zwischen Teilsequenzen des Mitochondriengenoms und der 3e*-cDNA-Sequenz zeigte eine Homologie von 98% zur UE I der Cytochrom C-Oxidase-Gene aus Ratte [111]. Nur 20 Nukleotide von 994 verglichenen Nukleotiden waren ausgetauscht (S. Abb.15).

Auch die Homologien zu den entsprechenden Bereichen der Mitochondriengenome anderer Eukaryoten waren sehr hoch und lagen zwischen 62% bei bestimmten Hefen (S. cerevisiae) und 84,4% bei Maus (S. Abb.15). Durch den Vergleich der 3e*-cDNA-Sequenz mit bereits vollständig sequenzierten Mitochondriengenomen (z.B. Maus, Mensch [113, 114]), deren Organisation sich bei höheren Eukaryoten nicht unterscheidet, war es möglich den nicht translatierten 3'-Bereich der 3e*-cDNA als vollständige Nukleotidsequenz des nicht codierenden Stranges der mt tRNA^{S*} zu identifizieren, der lediglich 1nt am 3'-Ende der 3e*-cDNA fehlt. Die mt tRNA^{S*} wird auf dem L-Strang des Mitochondriengenoms codiert, so daß die Transkriptionsrichtung gegenläufig zu der der Cytochrom C-Oxidase UE I ist, die auf dem H-Strang codiert wird.

Die vorhandenen Daten lassen nur den Schluß zu, daß die 3e*-cDNA eine Teilkopie des Cytochrom C-Oxidase-UE I-Gens, das auf dem Mitochondriengenom codiert ist, darstellt.

Mitochondrien-mRNAs werden als polycistronische Transkripte von einer einzigen Promotorregion, die in dem sogenannten 'D-Loop' liegt, transkribiert. Dieser D-Loop sollte somit auch Sequenzen für eine Estradiol-Rezeptorbindungsstelle [115] oder für 'Hormone Responsive Elements' (HRE) [5] enthalten, wenn die estradiol-stimulierte Zunahme des E1-Transkriptes ein primärer Hormoneffekt ist.

Da innerhalb des D-Loops (und auf dem übrigen Mitochondriengenom) keine derartigen Sequenzen gefunden wurden, handelt es sich bei dem für das E1-Transkript beobachteten Estradioleffekt wahrscheinlich um einen sekundären Hormoneffekt.

3.4. Charakterisierung der E2-cDNA-Klone

3.4.1. Restriktionsanalyse

Die aus der λ gt10-Bibliothek isolierten pE2-positiven cDNAs (3e, 9a, 12c, 20e, s. 3.2.) wurden zur Restriktionskartierung in den Vektor pUC18 subkloniert.

Alle in der cDNA des Ausgangsklons pE2 bekannten Einzelschnittstellen für Endonukleasen mit einer 6bp-Erkennungssequenz (SmaI, EcoRV, PstI, BglII) wurden auch für die obengenannten cDNAs verifiziert. Die SphI-Schnittstelle ist die Klonierungsstelle der pE2-cDNA in pAT153 (s. Abb.16 u. [38]), innerhalb der E2-Gesamtsequenz kommt sie allerdings auch als interne Schnittstelle vor (s. Abb.17 u. 18A).

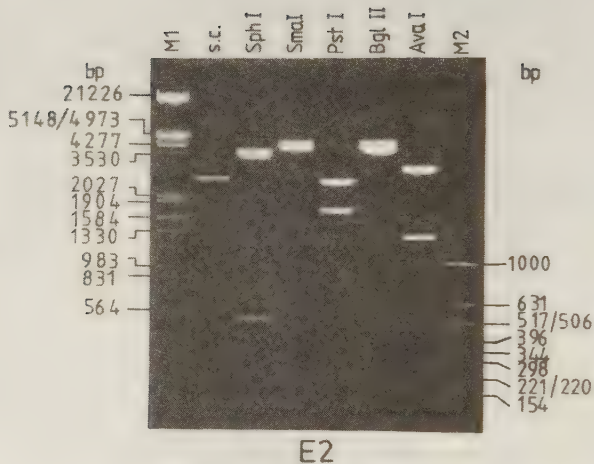


Abb. 16

Restriktion des E2-Klons pE2 (38)

Jeweils 1 µg der pE2-DNA wurde mit den über den Gelspuren angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandard diente EcoRI/HindIII-verdaute λSam7-DNA (M1) bzw. EcoRI/HinfI-verdaute pBR322-DNA (M2). Unverdaute pE2-DNA wurde in der mit s.c. bezeichneten Spur aufgetragen.

Zusätzlich wurden weitere Schnittstellen einiger Restriktionsenzyme mit 6bp-Erkennungssequenz innerhalb der E2-cDNA gefunden (s. Abb. 17), die zur Erstellung der Restriktionskarte und für die Sequenzierung der cDNAs ausgenutzt wurden.

Die aus verschiedenen Verdauungen der cDNAs 3e, 9a, 12c, 20e abgeleitete Restriktionskarte ist in Abb. 18A dargestellt.

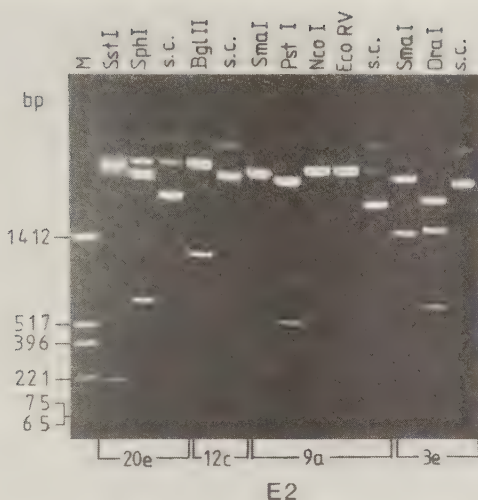


Abb. 17

Restriktionsanalyse der isolierten E2-Klone

Die isolierten cDNAs 3e, 9a, 12c und 20e, die unterschiedliche Bereiche der gesamten Sequenz des E2-Transkripts repräsentieren, wurden in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pUC18 [68] subkloniert. Nach der Verdauung mit verschiedenen, über der jeweiligen Gelspur angegebenen, Restriktionsenzymen wurden die erhaltenen Fragmente in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Bezeichnungen der Klone sind unterhalb der Gelspuren angegeben. Der Klon pUC18/12c enthält zweimal die cDNA 12c in Tandemanordnung. Deshalb entstehen bei der Restriktion dieses Klon mit BglII zwei Banden. (vgl. Abb. 18A). Als Längenstandard diente HinfI-verdaute pUC18-DNA. Die Längen der pUC18/HinfI-Fragmente sind in Basenpaaren angegeben. Gelspuren, die mit "s.c." bezeichnet sind, enthalten ungeschnittene DNA des jeweiligen Klon.

3.4.2. Subklonierungen der E2-cDNAs in verschiedene Vektoren

Die aus Lambda-Phagen isolierten E2-cDNAs (3e, 9a, 12c, 20e) wurden in das Plasmid pUC18 [68] subkloniert, weil kleine Plasmid-DNAs i. Vgl. zu λ gt10-DNA übersichtlichere Restriktionsmuster liefern. Die Erstellung einer Restriktionskarte wird also einfacher. Von Vorteil ist außerdem, daß sich Plasmid-DNA aus Minipräparationen bequemer und zur Fragmentisolierung in höheren Ausbeuten isolieren läßt.

Für die folgenden Sequenzierungen (s. 3.4.3.) nach Sanger *et al.* [74] wurden die E2-cDNAs jeweils in beiden Orientierungen in die Vektoren M13 mp18 [41] bzw. pBluescript KS+ (nur 20e und 12c) kloniert.

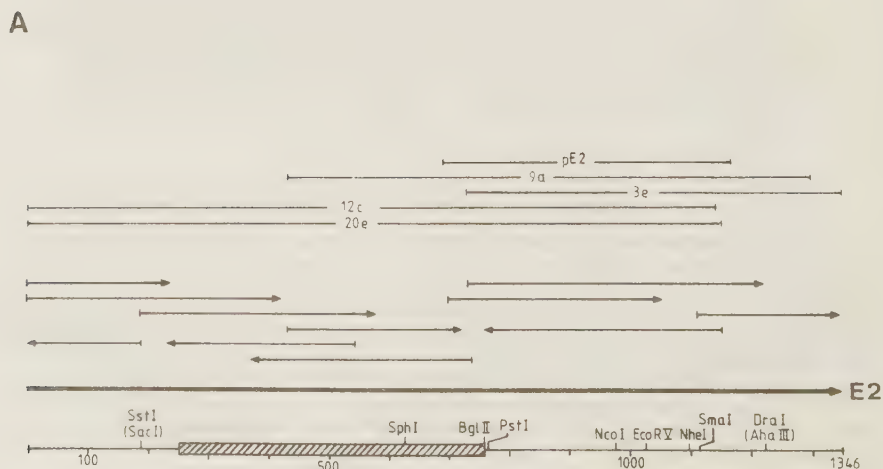
Jeder dieser beiden Vektoren bietet gewisse Vor- und Nachteile: So kann ssDNA und dsDNA aus M13-Phagen nach relativ kurzer

Wachstumszeit in höherer Ausbeute aus einer Bakterienkultur isoliert werden, wohingegen ssDNA aus pBluescript-Vektoren nur nach Zusatz eines Helferphagen und in geringerer Ausbeute isoliert werden kann. pBluescript ist allerdings der vielseitigere Vektor, der mehr Einzelklonierungsstellen innerhalb seines Polylinkers besitzt und durch den T3- bzw. T7-Promotor auch zur in vitro-Synthese von RNA benutzt werden kann.

3.4.3. Sequenzierung der E2-cDNA-Subklone

Die E2-cDNAs wurden mit Hilfe der Didesoxy-Strangterminationsmethode [74] sequenziert. Die in beiden Orientierungen in M13 mp18 einklonierten vier cDNAs (3e, 9a, 12c, 20e) dienten als Ausgangsklone zur Herstellung kürzerer Subklone (max. 450nt). Die Subklone wurden durch die Deletion kleinerer cDNA-Fragmente, die zwischen einer Einzelschnittstelle innerhalb der cDNA (s. Abb. 18A) und des M13 mp18-Polylinkers lagen, erhalten. Dazu wurden die Ausgangsklone jeweils mit SphI, SmaI, PstI und SstI restringiert und die erhaltenen Fragmente in einem niedrigschmelzenden Agarosegel aufgetrennt. Die höhermolekulare DNA, die das im linearisierten Vektor verbliebene cDNA-Fragment enthielt, wurde ausgeschnitten, im Gel religiert und transformiert. Die so erzeugten Subklone ermöglichten die schrittweise, überlappende Sequenzierung der E2-cDNA-Klone in beiden Orientierungen.

Abb. 18A (Legende s. folgende Seite):



saaccsaatagggatcttctcgtggtgctcgtggcggtgtccctcaactcgggtgctgaagatcaagggtctttctcttgggggtggg	- 177
actctgacctggtctctgtggggaggagagaggtgtgaggagaccacccgtgggggtgaggcagggtatttgagggaacaagggtataaatag	- 88
ccgagaggtgagctccctgggcaaggactggcacaagttctgctccaagtgtagcgctgcaacaagacactgacccctggcgccATG	+ 3
	1
<u>CTGAGCATGATGGGAAACCCCTCTGCCACAAGCCCTGTTATGCCACACTGTTTGGACCCAAAGCGTGAATATCGGGGGCGCTGGTTCCTA</u>	+ 93
L S M H G N P S A T S P V M P H C L D P K R E Y R G R H P L	31
<u>CATCTACGAGAAGCCTCCGACGGAGGCCCTCAGGTCACTGGCCCCATCGAGGTCCCTGTGGTACGAACCTCGAAGACGGGAAGACCAAGCG</u>	+ 183
H L R E A S D G G P S G H W P H R G P C G T N S K S G R P A	61
GGCCGCCAAGGGTCCAGCAAAAGCCTCTATGTCAACACGTTCTACTGGAGCCCAACATGTGCCCTCGATGCAACAAGAGAGTGTACTTC	+ 273
G R P R V P A K P L C H H V H W E P N M C P R C N K R R V Y F	91
<u>GCTGAGAAGGTGACCTCCCTGGGCAAGGACTGGCACCGACCTGCGCTCGGTGTGAGCGCTGCTCCAAGACACTGACCCAGCGGGGCAT</u>	+ 363
A E K V T S L G R D W H R P C P R C E R C S R T L T P G G H	121
<u>GCTGAGCATGATGGCAACCCCTACTGCCACAAGCCCTGCTATGGAATACTCTTTGGACCCAAAGGAGTGAATCTGGTGTGTGGGCAGC</u>	+ 453
A E H D G G Q P Y C H K P C Y G I L F G P K R G V N T G A V G S	151
<u>TACATCTACGACAAGGACCCCGAAGGCACAGTTCAGCCTtagatctgcagatgtgccctcgggtccctatttgacctgagggaga</u>	+ 543
Y I Y D K D P E G T V Q P	164
gtcaactgtctgctatgctcctcagtgctgtctgcctgcaattccagcacctaaagtgatggaggagaagcccaagctagtctcagaat	+ 633
tccaactcccttggtcaacttgccatgctctatgttgagcccggtttactttctgtctgtgtctccatagacccatgggtcctgtg	+ 723
tcccatgtccctgataactctccaagtggctgtcctatgatccctttgcccgacactgcccgccagagtattatttatagctctgct	+ 813
zaccatgataagcatgaactagctcacagactccggggtgagggcaccacgaagagagccctttgctggttcccactactccct	+ 903
acttaccctcacatgatttcacagctatgagatttactgtcctataaatagtttggtttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	+ 993
aaa	+1053

Abb. 18

A: Restriktionskarte der E2-cDNA

Aus Restriktionsverdauungen der Klone pE2, 3e, 9a, 12c u. 20e mit den angegebenen Endonukleasen wurde die gezeigte Restriktionskarte ermittelt, deren Skala die Längen in Basenpaaren angibt. Der schraffierte Bereich stellt den längsten offenen Leserahmen dar, der innerhalb der E2-Nukleotidsequenz gefunden wurde. Der dicke mit E2 bezeichnete Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung und die Transkriptlänge an. Die Längen der untersuchten cDNAs sind im oberen Teil der Abbildung als schwarze Balken dargestellt. Alle cDNAs wurden in die Vektoren M13 mp18 [41] und pBlueskript KS+ (nur 12c, 20e) subkloniert und nach Sanger et al. [74] sequenziert. Die sequenzierten Längen und die Sequenzierrichtung der entsprechenden Subklone werden durch die dünnen Pfeile markiert.

B: Nukleotidsequenz der E2-cDNA

Die DNA-Sequenz ist in 5'- nach 3'-Richtung durchnummeriert, wobei das erste Nukleotid des ATG-Initiationscodons mit +1 beziffert wurde. Die Nukleotide in 5'-Richtung vor dem ATG-Codon sind durch negative Zahlen gekennzeichnet. Die Zahlen auf der rechten Seite jeder Zeile beziehen sich auf das letzte Nukleotid der selben Zeile. Der längste, offene Leserahmen ist in Großbuchstaben geschrieben. Darunter ist die entsprechende Aminosäuresequenz, deren Numerierung (s. rechter Zeilenrand) mit dem Initiationsmethionin beginnt, angegeben. Der schwarze Balken markiert die Lage des putativen Polyadenylierungssignals [116], das sich 17nt stromaufwärts der Polyadenylierungsstelle befindet. Die unterstrichenen Sequenzbereiche (Nukleotid -88 bis +112 und +274 bis +474) markieren die interne Homologie.

Für die Sequenzierungsreaktionen wurde α - 35 S-dATP und modifizierte T7 DNA-Polymerase benutzt (s. 2.11.1.). Mit α - 35 S-dATP markierte DNA liefert in der Fluorographie sehr viel schärfere Banden als mit α - 32 P-markierte DNA, so daß der höhermolekulare Bereich der Sequenziergele eindeutiger und weiter "gelesen" werden kann. Häufig konnten deshalb bis zu 450 Basen in einer Gelspur bestimmt werden. Modifizierte T7 DNA-Polymerase (Hersteller: USB) bietet den Vorteil, daß infolge höherer Einbau-raten die eingesetzte Menge Radioaktivität gegenüber einer Sequenzierungsreaktion mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I herabgesetzt werden kann.

3.4.4. Analyse der E2-Nukleotidsequenz

Die durch Northernanalysen bestimmte E2-Transkriptlänge beträgt $\approx 1,3$ kb. Die pE2-cDNA mit einer Länge von 473nt repräsentiert also nur einen kleinen Teil der Gesamtsequenz. Mit Hilfe der cDNAs 3e, 9a, 12c und 20e aus der λ gt10-Bibliothek wurde die E2-Nukleotidsequenz nun komplettiert.

Dem Klon 20e, mit 1156bp der längste untersuchte E2-cDNA-Klon, fehlen lediglich 70nt des 3'-nichttranslatierten Transkriptbereichs. Die Sequenz des geringfügig kürzeren Klons 12c beginnt mit dem gleichen Nukleotid am 5'-Ende der 20e-cDNA-Sequenz und ist vollständig in dieser Sequenz enthalten. Die ca. 800bp lange 9a-cDNA enthält den gesamten 3'-Bereich des E2-Transkriptes und beginnt bei Nukleotid +180 der E2-Sequenz.

Der Klon 3e beginnt bei Nukleotid +468 und repräsentiert den gesamten 3'-Bereich des E2-Transkriptes einschließlich eines ca. 100bp langen poly(A)-Endes. Dieser Klon, mit einer Länge von >2 kb, besteht aus zwei unabhängigen cDNAs, wobei die zweite cDNA mit dem poly(A)-Ende der 3e-cDNA verbunden ist. Da die 3e-Nukleotidsequenz 100%ig homolog zur E2-Sequenz ist und sich 17bp stromaufwärts der Polyadenylierungsstelle ein Polyadenylierungssignal (AAUAAA [116]) befindet, gehört das poly(A)-Ende mit hoher Wahrscheinlichkeit zum E2-Transkript. Die Sequenz des Klons pE2 [38] reicht von Nukleotid +427 bis +903 der E2-Sequenz.

Die gesamte E2-cDNA-Sequenz hat eine Länge von 1318nt, korreliert also gut mit der durch Northern-Analysen bestimmten Transkriptlänge von $\approx 1,3$ kb. Die gezeigte E2-Sequenz (Abb.18B) ist der codierende DNA-Strang, der durch Northern-Hybridisierungen von Einzelstrang-DNA-Proben des Phagen M13 mp19, in den die pE2-cDNA subkloniert worden war, bestimmt wurde.

Die aus der E2-cDNA abgeleitete Proteinsequenz beginnt am 5'-proximalen AUG-Codon, das bei fast allen untersuchten eukaryotischen mRNAs als Initiationscodon für die Proteinbiosynthese fungiert [117]. Dieses AUG-Triplett liegt innerhalb einer Konsensussequenz (CCRCCAUG mit R=Purin, hier G) [117] für eine Ribosomenbindungsstelle. Ausgehend von diesem Initiationscodon erhält man eine hypothetische Proteinsequenz einer Länge von 164 Aminosäuren. Der offene Leserahmen endet bei Nukleotid +492 und führt zu einem Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 18239d. Dieses Protein - im folgenden ESP2 (Estradiol Stimulated Protein) genannt - sollte aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung basisch und sehr hydrophil sein. Da es kein Leptpeptid enthält (Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte u. Doolittle [118]), sollte es auch nicht sekretiert werden.

Auffällig ist außerdem ein hoher Gehalt an Prolin ($\approx 13\%$) und Cystein ($>6\%$).

3.4.5. Homologiesuche in der MicroGenie-Datenbank

Die Homologiesuche in der MicroGenie-Proteindatenbank (s. 2.17.3.) enthüllte eine signifikante Ähnlichkeit zwischen der ESP2-Sequenz (s. 3.4.4.) und der wegen ihres hohen Cystein-Gehaltes (9,1%) so genannten CRIP-Sequenz (CRIP=Cystein-Rich Intestinal Protein aus Ratte [119]).

Die Anordnung der Cysteinreste innerhalb der CRIP-Sequenz läßt eine gewisse Homologie zu den hochkonservativen Cystein-Sequenzblöcken einiger Ferredoxine erkennen. Da ESP2 diesen Sequenzbereich auch enthält, wurden in Abb.19 die Cystein-Sequenzblöcke aus CRIP und ESP2 dem aus *Megasphaera elsdenii* [120] gegenübergestellt. Die große Ähnlichkeit dieser Sequenzteile läßt eine funktionelle Beziehung zwischen CRIP und ESP2 einerseits, sowie den Pflanzen- bzw. Bakterienferredoxinen andererseits vermuten.

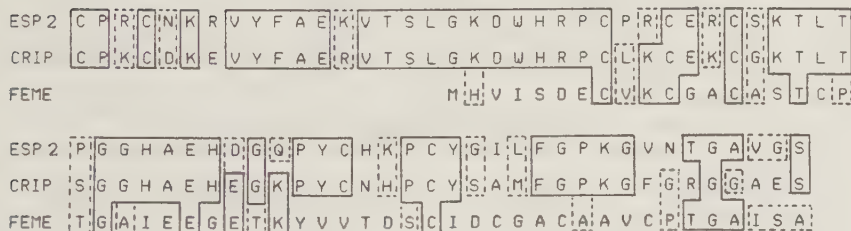


Abb. 19

Gegenüberstellung der ESP2-Sequenz mit der CRIP- und *M. elsdenii*-Ferredoxin (FEME)-Sequenz

Die Aminosäuren (AS) 82 bis 151 der ESP2-Sequenz wurden mit den AS 4 bis 73 der CRIP-[119] und AS 1 bis 52 der FEME-Sequenz [120] verglichen. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben. Durchgezogene Linien rahmen identische, gestrichelte Linien vergleichbare Aminosäuren ein. Als vergleichbar wurden die Aminosäuren innerhalb der folgenden Gruppen angesehen: 1.) R, K, H 2.) I, L, V, M 3.) F, Y, W 4.) A, G, T, S, P 5.) D, E, Q, N

Die Homologie zwischen ESP2 (AS 82 bis 151) und CRIP (AS 4 bis 73) beträgt 68,6%. Dabei sind 48 der verglichenen 70 Aminosäuren in beiden Sequenzen identisch. Da das CRIP aus nur 77 Aminosäuren besteht, erstreckt sich die obengenannte Homologie beinahe über die volle Proteinlänge. Die ESP2-Sequenz ist mit 164AS ungefähr doppelt so lang wie die CRIP-Sequenz. Interessanterweise findet man bei einer Analyse der cDNA-Sequenzen, daß die E2-cDNA eine hohe interne DNA-Homologie aufweist. Ein Vergleich der Nukleotide -88 bis +112 mit +274 bis +474 führt zu einer internen Homologie von 79,6% (160nt der 200 verglichenen sind identisch). Der letztgenannte Bereich (Nukleotid +244 bis +453) ist außerdem zu 69% homolog mit Nukleotid 71 bis 280 der CRIP-cDNA-Sequenz (145 identische Basen). Diese Homologie deckt fast den gesamten translatierten Bereich der CRIP-cDNA ab, gleichzeitig ist dies die duplizierte Region innerhalb der E2-cDNA-Sequenz.

3.5. RNA-Isolierung aus Rattengewebe

Eine Aussage über die Tumorspezifität des E2-Transkriptes kann nur durch Northern-Analysen der poly(A⁺)-RNA aus Rattengehirnen gesunder Tiere gewonnen werden. Gleichzeitig kann, falls E2 kein tumorspezifisches Transkript ist, durch die Untersuchung von poly(A⁺)-RNAs der übrigen Rattengewebe festgestellt werden, ob Gewebespezifitäten existieren. In diesem Fall sollten wegen der Estradiolstimulierbarkeit der E2-mRNA [38] auch geschlechtliche Dimorphismen nachzuweisen sein.

Die für die vorgenannten Untersuchungen benötigte poly(A⁺)-RNA wurde aus den Geweben von Wistar-Ratten isoliert. Herz, Leber, Lunge, Milz, Muskel, Niere, Testis und einzelne Gehirnregionen (Cortex, Cerebellum, Hippocampus) wurden getrennt aufgearbeitet. Bei je 5 männlichen und weiblichen Tieren wurden die Organe (nur Leber, Niere, Herz, Muskel- und Gehirnteile) zusätzlich nach Geschlecht getrennt zur RNA-Isolierung eingesetzt.

Die Organe wurden möglichst schnell entnommen und vor der weiteren Verarbeitung (s. 2.16.1.) sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und zur Anreicherung der poly(A⁺)-RNA einmal an oligo(dT)-Cellulose chromatographiert. Durch diesen Schritt wurde die poly(A⁺)-RNA auf 50% angereichert (Abschätzung nach Agarosegelen). Die Ausbeuten an poly(A⁺)-RNA (s. Tab.1) betrugen im Durchschnitt 4% der eingesetzten Gesamt-RNA. Die z.T. beträchtlichen Schwankungen in der poly(A⁺)-RNA-Ausbeute sind zum einen auf die unterschiedliche Größe der Tiere, zum anderen auf die unterschiedliche Effizienz des Gewebeaufschlusses bzw. auf die unterschiedlichen Bindungskapazitäten der verwendeten oligo(dT)-Cellulosesäulen zurückzuführen.

Tabelle 1:
Ausbeuten an Gesamt- und poly(A+)-RNA aus fünf Ratten

Gewebe/Geschlecht	Gesamt-RNA in [µg]	poly(A+)-RNA in [µg]
Cortex (m)	690	50
Cortex (w)	1050	50
Cerebellum (m)	750	40
Cerebellum (w)	360	20
Hippocampus (m)	260	--
Hippocampus (w)	300	--
Herz (m)	2500	70
Herz (w)	1600	100
*Leber (m)	11800	350
*Leber (w)	10000	560
*Lunge	3900	60
Milz	3800	110
*Muskel (m)	1800	50
*Muskel (w)	930	40
Niere (m)	9300	110
Niere (w)	7300	510
Testis	11000	210

*Für diese RNAs wurde nur ein Teil des zur Verfügung stehenden Gewebes aufgearbeitet.

Die Ausbeuten an poly(A+)-RNA wurden durch die Messung der A_{260} bestimmt. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} betrug bei allen Proben $\approx 2,0$. Die Intaktheit der isolierten poly(A+)-RNA wurde indirekt überprüft: Die nicht an die oligo(dT)-Cellulose bindende rRNA wurde in Methylquecksilberhydroxid-Gelen (s. 2.12.1.) aufgetrennt. Bildeten die 28S und 18S rRNA im Gel scharfe Banden, so galt auch die poly(A+)-RNA als intakt.

3.6. Gewebespezifitäten und sexuelle Dimorphismen des E2-Transkriptes in Ratte

3.6.1. Expression der E2-mRNA in verschiedenen Gehirnregionen

Das unter der Kontrolle von 17β -Estradiol stehende E2-Transkript wurde aus der C6 Glioma-Zelllinie isoliert [29]. Als Transkript glialen Ursprungs sollte es sich deshalb in poly(A+)-RNA aus Rattengehirnen nachweisen lassen, wenn es nicht tumorspezifisch

ist. Dieser Nachweis erwies sich als schwierig, solange poly(A⁺)-RNA aus Gesamtgehirn isoliert wurde: In Northern-Analysen lieferte diese poly(A⁺)-RNA, im Vergleich zu der aus estradiol-stimulierten C6 Glioma-Zellen, wesentlich schwächere Signalintensitäten.

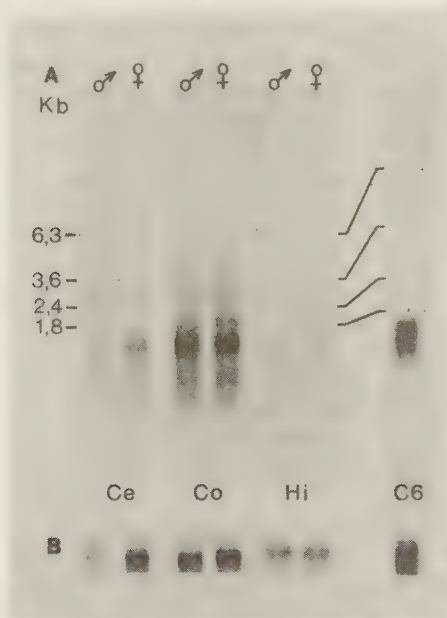


Abb. 20
Expression der E2-mRNA in verschiedenen Gehirnregionen der Ratte

A: Definierte Gehirnregionen männlicher und weiblicher Ratten wurden präpariert und die RNA für jedes Geschlecht getrennt isoliert (s. 2.16.). Poly(A⁺)-RNA (je 5µg) aus Cerebellum (Ce), Cortex (Co) sowie Hippocampus-RNA (Hi, je 20µg) beider Geschlechter wurde in einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Zum Vergleich wurde 5µg poly(A⁺)-RNA aus Ratten-C6 Glioma-Zellen, die 8h mit 10⁻⁶M 17β-Estradiol stimuliert worden waren, in einem 1%igen Formaldehydgel fraktioniert. Die RNAs wurden auf eine Nylonmembran (Nytran, Schleicher u. Schüll) transferiert (s. 2.14.) und mit 1x10⁷cpm/ml ³²P-markierter cDNA des Klons 20e (spez. Akt. 1x10⁹cpm/µg) hybridisiert (s. 2.15.2.). Die Belichtungszeit für die Autoradiographie betrug 14h bei -70°C. Als Längenstandard diente ribosomale RNA aus HeLa-Zellen bzw. aus *E. coli* (124).

B: Zur Standardisierung wurde die gleiche Filtermembran mit 1x10⁷cpm/ml einer ³²P-markierten β-Actin-Probe (spez. Akt. 1x10⁹cpm/µg) hybridisiert. Die Expositionszeit betrug 14h bei -70°C.

Durch die Präparation einzelner Gehirnregionen (Cortex, Cerebellum, Hippocampus) und die getrennte Untersuchung der darin enthaltenen poly(A⁺)-RNA konnte das Nachweisproblem für das E2-Transkript im Gehirngewebe beseitigt werden. Die auf diese Weise in Northern-Analysen erhaltenen Signalintensitäten sind insbesondere für Cortex-poly(A⁺)-RNA durchaus vergleichbar mit denen für C6 Glioma-poly(A⁺)-RNA. Cerebellum enthält beträchtlich weniger E2-mRNA als Cortex (s. Abb.20). Die für Hippocampus erhaltenen Signale können nur bedingt mit Cortex und Cerebellum verglichen werden, da in diesem Fall Gesamt-RNA untersucht wurde. Der Nachweis der E2-mRNA in den Gehirnen gesunder Tiere bedeutet auch, daß das E2-Transkript nicht tumorspezifisch exprimiert wird.

Gehirne männlicher und weiblicher Ratten enthalten durchschnittlich gleiche Konzentrationen an 17 β -Estradiol [24], so daß die E2-mRNA in den Gehirnen beider Geschlechter gleich stark exprimiert werden sollte. Die Hybridisierung der E2-cDNA 20e an poly(A⁺)-RNA aus Cortex und Cerebellum sowie an Hippocampus-RNA männlicher und weiblicher Ratten bestätigte diese Erwartung (s. Abb.20): Die Expression der E2-mRNA im Gehirn ist sexuell nicht dimorph. Die weniger starke Hybridisierung der poly(A⁺)-RNA aus Cerebellum männlicher Ratten findet sich auch in der β -Actin-Kontrollhybridisierung (vgl. Abb.20A u. B) und ist auf Unterschiede in der aufgetragenen Menge an poly(A⁺)-RNA zurückzuführen.

3.6.2. Expression der E2-mRNA in verschiedenen somatischen Organen

Im Gegensatz zum Gehirn (s. 3.6.1.) ist die Estradiolkonzentration im Körper männlicher und weiblicher Tiere stark unterschiedlich, so daß die Expression des estradiolregulierten E2-Transkriptes in Abhängigkeit vom untersuchten Geschlecht und Gewebe starken Schwankungen unterliegt. Die Unterschiede in der E2-Transkriptmenge wurden getrennt nach Geschlecht für verschiedene Gewebe untersucht (s. Abb.21).

Generell wird die E2-mRNA in Herz-, Lungen- (nicht abgebildet) und Lebergewebe sehr stark exprimiert. In Niere und Milz (nicht abgebildet) tritt sie in geringeren Konzentrationen auf, in Muskelgewebe sind keine signifikanten Mengen an E2-mRNA nachweisbar. Eine Besonderheit, die aus den vorhandenen Daten nicht erklärt werden kann, stellt die Hybridisierung eines $\approx$ 2,2kb langen Transkriptes in Testis dar (s. Abb.21).

Die für das E2-Transkript gefundenen Gewebespezifitäten sind nicht kongruent mit dem Auftreten der CRIP-mRNA [119], zu der die E2-mRNA eine hohe Homologie zeigt (s. 3.4.5.). Die CRIP-mRNA tritt in den höchsten Konzentrationen im Dünn- und Dickdarm adulter Ratten auf. Geringe Mengen der CRIP-mRNA wurden auch in Lunge, Milz, Nebennierenrinde und Testis nachgewiesen. Dagegen kommt CRIP-mRNA in Leber, Gehirn und Niere nicht vor.

Ein geschlechtlicher Dimorphismus der CRIP-Expression ist nicht bekannt. Im Gegensatz dazu scheint die Expression der E2-mRNA zumindest in Herz, Leber und Nieren sexuell stark dimorph zu

sein. In diesen Organen kommt die E2-mRNA in Weibchen ca. 10-50x häufiger vor als in Männchen. Diese Beobachtung korreliert auch gut mit der Stimulierung der E2-mRNA-Synthese in C6 Glioma-Zellen durch 17 β -Estradiol.

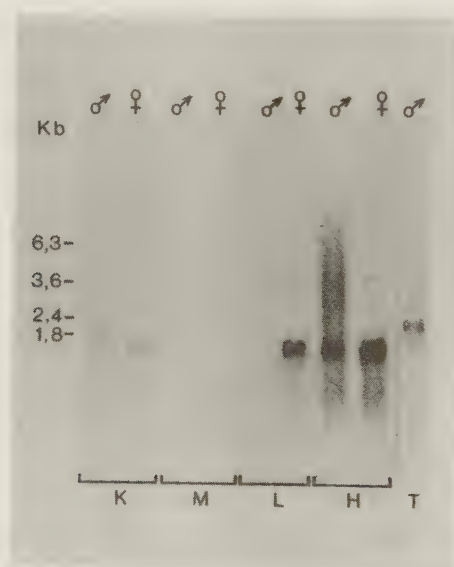


Abb. 21

Dimorphe Expression der E2-mRNA in Organen männlicher und weiblicher Ratten

Poly(A⁺)-RNA aus verschiedenen Organen weiblicher bzw. männlicher Ratten wurde getrennt isoliert (s. 2.16.) und in einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (s. 2.12.1.). In jeder Spur des Gels wurden 5 μ g poly(A⁺)-RNA aus Herz (H), Niere (K), Leber (L; nur 2,5 μ g in Spur ♂), Muskel (M) und Testis (T) männlicher (♂) bzw. weiblicher (♀) Ratten aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die RNA auf eine Nylonmembran (Nytran, Schleicher & Schüll) transferiert (2.14.) und mit 1×10^7 cpm/ml ³²P-markierter cDNA des Klon 20e (spez. Akt. 1×10^5 cpm/ μ g) hybridisiert (s. 2.15.2.). Die Expositionszeit für die Autoradiographie betrug 2,5h bei -70°C. Die Längenstandards sind die gleichen wie in Abb. 20.

4. Diskussion

Das Gewebe des Zentralnervensystems besteht aus einer Reihe sehr verschiedener Zelltypen, die sich zwei Hauptklassen zuordnen lassen:

1. den Neuronen und
2. den Gliazellen.

Gliazellen und Neuronen existieren in einer Art Symbiose [125]. Die Gliazellen, deren Anzahl die der Neuronen im Gehirn um das ungefähr Zehnfache übertrifft, können wiederum aufgrund ihrer Funktion und ihres Aussehens in vier Gruppen eingeteilt werden [125]:

1. Die fibrösen und protoplasmischen Astrozyten, die sowohl mechanische als auch metabolische Unterstützungsfunktionen für die Neuronen erfüllen.
2. Die Oligodendrozyten, die durch die Myelinbildung die Nervenendigungen im Zentralnervensystem isolieren und funktionelle Analoga der Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems sind.
3. Die Ependymzellen, die das Gefäßsystem im Gehirn umgeben und Hohlräume ausfüllen.
4. Die Mikroglia, die am Myelinabbau beteiligt sind und eine Art spezialisierter Makrophagen darstellen.

Gliazellen sind am Metabolismus von Neurotransmittern beteiligt [125, 126, 132] und sorgen möglicherweise durch ihre Ionenkanäle [128] für ein Ionenmilieu, in dem die Funktionsfähigkeit der Neuronen erhalten bleibt. Obwohl die Blut-Hirn-Schranke durch die Endothelzellen gebildet wird, scheinen Gliazellen an der Entwicklung und Erhaltung dieser Schranke beteiligt zu sein [127].

Eine sehr wichtige Aufgabe üben die Gliazellen während der Embryonalentwicklung aus, indem sie eine Art Wegweiserfunktion für die wachsenden Dendriten und Axone bei der Neurogenese übernehmen (radial glial guides) [129, 130]. Außerdem tragen Gliazellen durch trophische Faktoren zum Erhalt und zur Regenerierung von Neuronen bei [126, 131].

All diese Vorgänge unterliegen einer komplexen Steuerung und können im intakten Gewebe, bedingt durch die Heterogenität der Zelltypen im zentralen Nervensystem, nur sehr schwer oder gar nicht untersucht werden.

Eine wesentliche Vereinfachung für die Untersuchung von Regulationsvorgängen, wie sie auch durch Steroidhormone hervorgerufen werden, stellt die Verwendung einer Zelllinie dar. Zelllinien haben zudem den Vorteil der Immortalität. Die mit Hilfe

von Zelllinien gewonnenen Ergebnisse bedürfen allerdings einer kritischen Überprüfung in bezug auf ihre Allgemeingültigkeit, da durch den Tumorcharakter der Zelllinien (z.B. das Fehlen von Zell-Zell-Kontakten) artifizielle Resultate erzielt werden könnten.

Zur Herstellung der in der vorliegenden Arbeit benutzten cDNA-Bibliothek wurde poly(A⁺)-RNA aus der C6 Glioma-Zelllinie [29] isoliert. Diese Zelllinie glialen Ursprungs wurde durch intracraniale Injektion von N-Nitrosomethylharnstoff, der in Ratten spezifisch Gehirntumore induziert, erhalten. Dazu wurden die Zellen des Primärtumors in Kultur gehalten und nach einer weiteren Passage durch Ratten, d.h. Injektion der Primärzellen in neugeborene Tiere, als klonale Zelllinie etabliert. Aufgrund ihrer Morphologie und des Nachweises von Astrozyten-spezifischem S100-Protein wurde diese Zelllinie den Gliazellen zugeordnet [29].

Für die C6 Glioma-Zelllinie waren eine Reihe von Steroidhormoneffekten beschrieben worden, so daß es sinnvoll erschien, diese Zelllinie als Modellsystem für die Isolierung von steroidhormonregulierten Transkripten aus Gehirnzellen zu benutzen. So wird durch Glucocorticoid die Glycerinphosphat-Dehydrogenase [35] und die Glutamin-Synthetase [30] induziert, während gleichzeitig die Proliferation der Zellen inhibiert wird [34]. In Gegenwart β -adrenerger Agonisten stimuliert Glucocorticoid die Expression von Preproenkephalin-mRNA [31]. Außerdem werden durch dieses Hormon morphologische Veränderungen der Zellen hervorgerufen [32]. Auch 17 β -Estradiol induziert einige Veränderungen wie z.B. eine Aktivitätssteigerung der Cerebrosid-Sulfotransferase, die am Myelinaufbau beteiligt ist, um 200% sowie die gleichzeitige Reduktion der Cholesterinsynthese um 40% [36]. Eine Stimulation der NGF-Synthese und -Sekretion durch 17 β -Estradiol, wie sie von Perez-Polo *et al.* [37] beobachtet worden war, konnte von Arenander und de Vellis [33] nicht reproduziert werden, so daß dieses Ergebnis umstritten bleibt.

Die von M. Vlahova [38] beobachteten Effekte von 17 β -Estradiol auf die C6 Glioma-Zelllinie, sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptionsebene, führten zur Isolierung zweier estradiolstimulierbarer Transkripte, E1 und E2. Diese Transkripte waren lediglich stimulierbar, nicht aber induzierbar, da sie auch in poly(A⁺)-RNA aus unbehandelten Vergleichszellen als schwache Hybridisierungen auf Northern-Blots nachweisbar waren. Die Stimulation durch das Steroidhormon war spezifisch für 17 β -Estradiol, da eine Stimulation der Transkription von E1 und E2 mit Glucocorticoid nicht möglich war. Eine Behandlung der Zellen mit Cycloheximid hatte keinen Einfluß auf die E1- bzw. E2-Transkriptmenge, so daß davon ausgegangen wurde, daß die beobachtete Wirkung von 17 β -Estradiol ein primärer Hormoneffekt ist [38]. Die Häufigkeit der Transkripte E1 bzw. E2 ist wesentlich geringer als die der Transkripte für β -Actin oder β -Tubulin, wobei E1 häufiger in der Zelle vorkommt als E2 (vgl. 3.2.), das ca. 1/10 der Menge der β -Actin-mRNA ausmacht.

Obwohl wahrscheinlich in der C6 Glioma-Zelllinie wesentlich mehr estradiolregulierte Transkripte auftreten (z.B. nimmt die Häufigkeit von vier Proteinen nach Stimulation der Zellen mit 17 β -Estradiol zu [38].), konnten aufgrund der limitierten Anzahl

von Rekombinanten aus der von M. Vlahova hergestellten cDNA-Bibliothek nur zwei cDNAs isoliert werden, die estradiolstimulierbare Transkripte repräsentieren. Beide cDNAs besitzen keinen offenen Leserahmen und sind relativ kurz (E1-cDNA: 268bp, E2-cDNA: 473bp) in bezug auf die Länge der Transkripte (E1 $\approx$ 1,6kb, E2 $\approx$ 1,3kb). In keiner dieser cDNA-Sequenzen wurde ein Polyadenylierungssignal [116, 134] oder ein poly(A)-Ende gefunden.

Um die estradiolsensitiven Transkripte E1 bzw. E2 näher charakterisieren zu können, war es nötig, vollständige oder zumindest längere cDNAs dieser Transkripte zu erhalten.

Aus poly(A⁺)-RNA estradiolbehandelter C6 Glioma-Zellen wurde deshalb eine neue cDNA-Bibliothek hergestellt, die sowohl lange cDNAs (durchschnittlich >500bp) als auch eine hohe Anzahl von Rekombinanten enthalten sollte. Diese beiden Forderungen wurden durch die Klonierung größenselektionierter cDNA in den Phagenvektor λ gt10 erfüllt, der *in vitro* in Phagenpartikel verpackt wurde.

In vitro-verpackte Phagen-DNA erreicht Infektionseffizienzen, die erheblich höher liegen als die Transformationsraten, die mit Plasmid-DNA durch die üblicherweise benutzte CaCl_2 -Methode erreicht werden können [105]. Dabei unterscheidet sich die Infektiosität der *in vitro* erzeugten Phagen nicht von der *in vivo* entstandener Phagen.

Das zur *in vitro*-Verpackung der rekombinanten λ gt10-DNA benutzte Verpackungslysate wurde nach der Methode von Enquist und Sternberg [46] hergestellt und erreichte eine Verpackungseffizienz von 5×10^7 pfu/ μ g λ gt10-DNA. Diese Verpackungseffizienz ist vergleichbar mit der kommerziell erhältlicher Verpackungslysate, die eine Effizienz von $\approx 1 \times 10^8$ pfu/ μ g Lambda-Wildtyp-DNA haben. Die Länge der λ gt10-DNA beträgt nur ca. 86% der Lambda-Wildtyplänge und ist möglicherweise für die geringfügig schlechtere Verpackungseffizienz verantwortlich.

Wie sich später herausstellte, kann eine Verbesserung der Verpackungseffizienz erreicht werden, wenn die Prophagen der zur Herstellung der Verpackungslysate verwendeten Bakterienstämme BHB2688 und BHB2690 [43] möglichst schnell induziert werden. Dies wird durch den Zusatz von kochendem CY -Medium zu der stark gerührten Bakterienkultur erreicht, so daß sich die Induktionstemperatur fast schlagartig einstellt.

Von größter Wichtigkeit bei der Herstellung der Verpackungslysate ist die Eliminierung der endogenen Phagen-DNA [43, 105], die andernfalls während der *in vitro*-Verpackung mit der rekombinanten Phagen-DNA kompetiert. Im Unterschied zur Methode nach Enquist und Sternberg [46] wurde durch eine Ultraschall-Behandlung beider Lysate (SE und FTL) die Phagen-DNA soweit zerstört, daß sie nicht mehr verpackt werden konnte. Ein "Hintergrund" nicht rekombinanter Phagen, verursacht durch endogene Phagen-DNA des Verpackungslysats, konnte auf diese Weise vermieden werden.

Eine prinzipiell einfachere Lösung, das Verpacken endogener Phagen-DNA zu verhindern, bieten die neuentwickelten Verpackungslysate aus Bakterienstämmen, die einen Prophagen mit einer cos-Deletion enthalten [135]. Hieraus ergibt sich ein weiterer Vorteil: Zur Herstellung des Verpackungslysats ist nur noch ein Bakterienstamm erforderlich, da der enthaltene Prophage für alle notwendigen Verpackungsproteine codiert, ohne selbst verpackt werden zu können.

Um die Forderung nach langen cDNA-Transkripten erfüllen zu können, wurden die Bedingungen für die Synthese des ersten Stranges optimiert. Einwertige Kationen (Na^+ , K^+) erhöhen die Effizienz der reversen Transkription und die Anwesenheit von K^+ -Ionen führt zu längeren Transkripten [95], was durch die Vorversuche bestätigt wurde (s. 3.1.2.). Die Verwendung von M-MLV Reverser Transkriptase sollte auch zur Synthese langer cDNAs beitragen, da sie gegenüber der üblicherweise verwendeten AMV Reversen Transkriptase weniger endonukleolytische und RNase-Aktivität besitzt (Herstellerangabe: Gibco-BRL, (1985) Focus Vol.7 Nr.1).

Die bei jeder cDNA-Synthese zwangsläufig entstehenden kurzen cDNAs ($< 500\text{bp}$), die erfahrungsgemäß bevorzugt kloniert werden [105], wurden durch eine Gelfiltration entfernt. Gleichzeitig wurden durch diese Größenselektion alle überschüssigen Linkermoleküle, die gewöhnlich zu einem großen Anteil scheinbarer Rekombinanten in cDNA-Bibliotheken führen [47], vor dem Klonierungsschritt abgetrennt.

Die Wahl des Phagen $\lambda\text{gt}10$ als Vektor ermöglichte eine effiziente Selektion gegen nicht rekombinante Phagen, da die cDNA in die EcoRI-Schnittstelle der Phagen-DNA einkloniert wurde. Durch die Insertion der cDNA wird das Phagen-Repressorgen cI zerstört, so daß rekombinante Phagen in hfl -Bakterienstämmen lytisch wachsen und Plaques bilden. Nicht rekombinante Phagen wachsen dagegen nur lysogen, können also keine Plaques ausbilden [47].

Zur Synthese der cDNA mußten relativ große Mengen an poly(A⁺)-RNA ($10\mu\text{g}/\text{Syntheseansatz}$) eingesetzt werden, da durch die Vielzahl der Extraktionen und Fällungen sowie durch die Größenselektionierung der cDNA hohe Ausbeuteverluste entstanden (s. Abb.4). Ein großer Teil dieser Verluste kann durch die neuerdings kommerziell erhältlichen EcoRI-Adaptoren vermieden werden, die anstelle der EcoRI-Linker eingesetzt werden. Durch diese Maßnahme entfällt die Methylierung der cDNA sowie das Zurückschneiden der Linker. Eine Durchführung der cDNA-Synthese als "Eintopfreaktion" macht dann nur noch eine Extraktion und eine Fällung bis zum Klonierungsschritt notwendig (Mitteilung der Fa. Pharmacia-LKB (1988) in Anal. Vol.15 Nr.3 und der Fa. Gibco-BRL (1987) in Focus Vol.9 Nr.1).

Zur Isolierung der Lambda-cDNA-Klone für E1 und E2 wurden die vorhandenen Plasmid-Klone pE1 bzw. pE2 eingesetzt. Da es sich bei diesen Klonen um Derivate des Plasmids pAT153 handelt, konnte die gesamte Plasmid-DNA radioaktiv markiert und zur Plaquehybridisierung eingesetzt werden, ohne daß Kreuzhybridisierungen mit der $\lambda\text{gt}10$ -DNA befürchtet werden mußten.

Für das E1-Transkript wurde die cDNA 3e^* isoliert, die die cDNA-Sequenz des pE1-Klons vollständig enthält. Trotz einer Länge von beinahe 1kb , was ca. $2/3$ der E1-Transkriptlänge ausmacht, konnte innerhalb der 3e^* -cDNA-Sequenz kein längerer durchgehender Leserahmen gefunden werden. Dennoch wurde mit den drei theoretisch möglichen Proteinsequenzen auf dem codierenden DNA-Strang, der vorher bestimmt worden war [38], eine Suche in der Protein Datenbank (National Biomedical Research Foundation, 1987) durchgeführt. Die Stoppcodons innerhalb dieser drei hypothetischen Proteinsequenzen wurden dabei als Aminosäure X translatiert. Die Suche enthüllte für eine der drei Proteinsequenzen eine hohe Homologie zur Cytochrom C-Oxidase UEI verschiedener Spezies. Daß diese Sequenzhomologie gleich mehrfach gefunden wurde, ist nicht

weiter verwunderlich, da die Cytochrom C-Oxidase in allen bisher untersuchten Spezies eine sehr konservierte Sequenz besitzt. Viel interessanter ist die Tatsache, daß sich die Cytochrom C-Oxidase als wichtiges Enzym der Atmungskette aus fünf bis neun Untereinheiten aufbaut (Die Zahl der Untereinheiten schwankt je nach Spezies) [110, 112, 146], deren größte, I, II und III, immer im Mitochondriengenom codiert werden [109]. Mitochondrien benutzen aber einen leicht abgewandelten genetischen Code, in dem das im Kern als Terminationscodon gelesene UGA als Tryptophan und das Kerncodon AUA für Isoleucin als Methionin gelesen wird [109, 110]. Nach Untersuchung der 3e*-cDNA-Sequenz mit Hilfe des mitochondrialen Codes ergab sich ein 925nt langer offener Leserahmen (nt 2-926, s. Abb. 13) mit einer Homologie von mehr als 97% zur Cytochrom C-Oxidase UEI aus Ratte. Diese Homologie beträgt bei einem Vergleich der Nukleinsäuresequenzen sogar 98%, wobei in dem homologen Sequenzbereich lediglich 20nt gegenüber der Cytochrom C-Oxidasesequenz der UEI aus Ratte [111] ausgetauscht sind. Dreizehn der ausgetauschten Basen stimmen allerdings mit den entsprechenden Basen im Maus-Mitochondriengenom [113] überein, so daß ein Teil der ausgetauschten Nukleotide wahrscheinlich auf Sequenzierfehler in der publizierten Rattensequenz zurückgeführt werden kann (vgl. Abb. 15). Ob es sich bei den verbleibenden 5 Basenaustauschen um Polymorphismen innerhalb einer Spezies [109, 110] oder auch um Sequenzierfehler handelt, bleibt offen. Bei einer genaueren Analyse der Nukleotidsequenz der 3e*-cDNA stellte sich heraus, daß der sich an das Stoppcodon (Nukleotid 926) anschließende Sequenzteil homolog zum Gegenstrang der mt tRNA^{Ser} ist.

Neben den oben beschriebenen Sequenzhomologien sprechen eine Reihe anderer Fakten dafür, daß es sich bei der 3e*-cDNA um den 3'-Bereich des Cytochrom C-Oxidase-UEI-Gens handeln kann:

1. Die Methode des Zellaufschlusses (s. 2.3.1.) ermöglicht auch die Isolierung mitochondrialer mRNA.
2. Die Northern-Analysen zeigen, daß die E1-mRNA ein relativ häufiges Transkript ist, das in allen untersuchten Geweben vorkommt (s. 3.2. und [38]), wie man es für ein wichtiges Enzym der Atmungskette erwarten würde. Das E1-Transkript ist also weder tumor-, gehirn- noch C6-zell-spezifisch.
3. Die hypothetische 3e*-Proteinsequenz enthält einen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren, wie es für ein intrinsisches Membranprotein (Cytochrom C-Oxidase) der inneren Mitochondrienmembran gefordert werden muß [112].
4. Beide Stränge des Mitochondriengenoms werden von je einer Promotorregion aus transkribiert. Dabei entstehen polycistronische Primärtranskripte des H-Stranges, der die Cytochrom C-Oxidase codiert, und des L-Stranges, der die mt tRNA^{Ser} codiert [109]. Dies erklärt die beschriebenen Homologien der 3e*-cDNA zu den Genen der Cytochrom C-Oxidase UEI sowie zur mt tRNA^{Ser} und macht die beschriebene Überlappung der Gene um ein Nukleotid möglich (s. 3.3.3.) [111].
5. Die durch Northern-Analysen bestimmte Transkriptlänge für das E1-Transkript beträgt ≈1,6kb und ist in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwert für die Cytochrom C-Oxidase UEI-mRNA [110].

6. Bis auf 3 Ausnahmen besitzt keine der identifizierten mitochondrialen Säuger-mRNAs einen 3'-nichttranslatierten Bereich. Eine der Ausnahmen bildet die mRNA der Cytochrom C-Oxidase UEI, deren 3'-nichttranslatierte Region aufgrund der mt-Genorganisation homolog zum Gegenstrang der mt tRNA^{suc} sein muß [109]. Auch dieser Befund korreliert gut mit der gefundenen 3e*-cDNA-Sequenz.

Die mt mRNAs besitzen kein Polyadenylierungssignal, sind an ihrem 3'-Ende aber polyadenyliert [110]. Diese Polyadenylierung ist häufig essentiell, da viele mt mRNAs nur ein unvollständiges Stoppcodon besitzen, das erst durch das Anhängen des poly(A)-Endes zum terminierenden Triplet wird [111, 141]. Ein poly(A)-Ende sollte also auch in der 3e*-cDNA-Sequenz enthalten sein, zumal die zur cDNA-Synthese eingesetzte RNA von einer oligo(dT)-Cellulosesäule eluiert worden war. Das Fehlen dieser poly(A)-Sequenz kann vielleicht dadurch erklärt werden, daß mt mRNAs nur kurze poly(A)-Enden besitzen [109], die durch RNase-Kontaminationen während der cDNA-Synthese besonders schnell abgebaut werden können.

Da es sich bei der 3e*-cDNA offenbar um eine Teilkopie der Cytochrom C-Oxidase-UEI-mRNA handelt, ist es möglich, daß 17 β -Estradiol den Energiestoffwechsel der Zelle über eine Regulation der Transkriptmenge beeinflusst.

Wie aber wird die Steroidhormonwirkung auf die Transkription dieses mitochondrialen Gens vermittelt? Es ist zwar bekannt, daß auch Steroidhormone wie Cortisol und Cortison den Stoffwechsel der Mitochondrien beeinflussen, die Mechanismen dieser Wirkung sind aber ungeklärt [136, 137, 138]. Da die Synthese der E1-mRNA trotz Cycloheximidbehandlung der Zellen durch 17 β -Estradiol stimuliert wurde, können kerncodierte, estradiolabhängige Proteinfaktoren nicht an der erhöhten Transkription beteiligt sein. Dennoch bleibt ungeklärt, ob die Wirkung von 17 β -Estradiol einem primären oder sekundären Hormoneffekt zuzuschreiben ist, da die Proteinbiosynthese in Mitochondrien nur durch Chloramphenicol inhibiert werden kann. Eine Suche auf den Mitochondriengenomen verschiedener Spezies nach Sequenzen, die Ähnlichkeiten zu den bekannten "Hormone Responsive Elements" [3, 5, 7] zeigen und somit primäre Hormonwirkungen vermitteln könnten, blieb erfolglos. Die Frage nach der Wirkungsweise von 17 β -Estradiol auf die Transkription in Mitochondrien kann abschließend also nicht beantwortet werden und sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein, die eine Behandlung der Zellen mit Chloramphenicol einschließen.

Auch das E2-Transkript scheint in ein Protein translatiert zu werden. Die mit der pE2-Probe erhaltenen Lambda-cDNA-Klone 3e, 9a, 12e und 20e wurden sequenziert und repräsentieren zusammen ein 1318nt langes Transkript. Diese Transkriptlänge stimmt sehr gut mit der durch Northern-Analysen bestimmten von $\approx$ 1,3kb überein. Der längste offene Leserahmen innerhalb der vereinigten cDNA-Sequenz codiert für ein Protein von 18239d, dessen putatives Initiationscodon innerhalb einer Konsensussequenz (CCRCAUG mit R=Purin) [140] für den Start der Proteinbiosynthese liegt. Außerdem enthält diese cDNA-Sequenz sowohl ein ca. 100nt langes po-

ly(A)-Ende als auch ein Polyadenylierungssignal (AAUAAA), das 17bp stromaufwärts der Polyadenylierungsstelle und damit innerhalb des üblichen Bereichs für ein solches Signal liegt [134]. Der Klon 3e stellt eine Besonderheit dar. Er übertrifft mit einer Länge von >2kb die erwartete Transkriptlänge, enthält also wahrscheinlich einen Sequenzbereich, der nicht homolog zum E2-Transkript ist. Diese Annahme wurde durch die Sequenzierung bestätigt: Ein Teil dieser cDNA enthält das komplette 3'-Ende der E2-cDNA einschließlich eines poly(A)-Teils, der aus den obengenannten Gründen für das poly(A)-Ende des E2-Transkripts gehalten wird. Der zweite Teil der 3e-cDNA, der unmittelbar hinter der poly(A)-Sequenz beginnt, ohne durch eine Linkersequenz unterbrochen zu werden, hat keinerlei Homologie zur E2-cDNA-Sequenz. Offenbar wurden in diesem Fall zwei unabhängige cDNAs miteinander verknüpft, noch bevor sie mit Linkern versehen worden waren.

Nach den Erfahrungen mit dem E1-Transkript wurde die E2-cDNA-Sequenz sofort mit bekannten mitochondrialen Sequenzen verglichen. Da keine Sequenzhomologien gefunden wurden, muß E2 ein kerncodiertes Transkript sein. Dieses Transkript wird höchstwahrscheinlich durch einen primären Hormoneffekt von 17 β -Estradiol stimuliert, da es auch in Gegenwart von Cycloheximid vermehrt auftritt. Möglich wäre aber auch eine Stabilisierung der E2-mRNA durch das Steroidhormon.

17 β -Estradiol zirkuliert im Blut weiblicher Ratten. Deshalb würde man erwarten, daß die hormonregulierte E2-mRNA in vielen peripheren Zielgeweben dieser Tiere exprimiert wird. Mit Northern-Analysen wurde diese Erwartung teilweise bestätigt, denn in Leber, Herz und Nieren weiblicher Tiere wird die E2-mRNA stärker exprimiert als in den entsprechenden Organen männlicher Tiere (s. Abb. 21). Die geringere, aber immerhin vorhandene, Expression der E2-mRNA in Organen männlicher Tiere kann nur durch eine konstitutive Expression des E2-Gens erklärt werden. Daß estrogen-sensitive Gene auch innerhalb desselben Organismus in einigen Organen hormonkontrolliert, in anderen aber konstitutiv exprimiert werden, ist bekannt [142].

Überraschenderweise wurde in Testis ein etwa 2,2kb langes Transkript entdeckt, das mit der E2-cDNA hybridisiert. Das Gewebe, in dem dieses Transkript auftritt, macht eine Regulation durch 17 β -Estradiol unwahrscheinlich. In welchem Bezug dieses Transkript zur E2-mRNA steht wurde nicht geklärt.

Das im Blut männlicher Tiere zirkulierende Testosteron kann nach Passieren der Blut-Hirnschranke in 17 β -Estradiol umgewandelt werden [23], was dazu führt, daß die Konzentration von 17 β -Estradiol in den Gehirnen beider Geschlechter ähnlich hoch ist. Auch die generelle Verteilung der Estradiolrezeptoren in den Gehirnen beider Geschlechter ist etwa gleich [24]. Eine estradiolabhängige mRNA könnte also in den peripheren Zielorganen sexuell dimorph, in den Gehirnen aber unabhängig vom Geschlecht gleich stark exprimiert werden.

Northern-Analysen mit poly(A⁺)-RNA aus verschiedenen Gehirnregionen bewiesen eindeutig (s. Abb. 20), daß die E2-mRNA zwar regional unterschiedlich verteilt ist (Cortex > Cerebellum > Hippocampus), zwischen den Geschlechtern aber keinerlei Mengenunterschiede nachweisbar sind. Offenbar ist die Expression der E2-mRNA in den Gehirnen beider Geschlechter durch 17 β -Estradiol

stimulierbar.

Aufgrund der vorhandenen Daten kann festgestellt werden, daß das E2-Transkript, das aus einer glialen Tumorzelllinie isoliert wurde, weder tumorspezifisch noch gehirnspezifisch exprimiert wird.

Ein Vergleich der ESP2-Sequenz, die aus der E2-cDNA-Sequenz abgeleitet worden war, mit den in der Datenbank (National Biomedical Research Foundation, 1987) gespeicherten Proteinsequenzen ergab eine Homologie zum CRIP-Protein [119], die innerhalb des homologen Sequenzbereichs 69% beträgt.

Die CRIP-mRNA wird während der postnatalen Säugephase junger Ratten intestinal akkumuliert und zwar zu dem Zeitpunkt, an dem die Ratten ihre Ernährung von der Muttermilch auf Eigenernährung umstellen. Vermutlich wird die Akkumulation der CRIP-mRNA durch Ernährungsfaktoren oder Hormone ausgelöst [119, 145].

Vergleicht man die Nukleotidsequenzen der entsprechenden Transkripte, so fällt auf, daß beinahe der gesamte translatierte Bereich der CRIP-cDNA homolog zur E2-cDNA ist (s.3.4.5.) und innerhalb der E2-cDNA-Sequenz dupliziert vorliegt. Diese interne Duplikation innerhalb der E2-cDNA-Sequenz weist eine Homologie von beinahe 80% auf (s. Abb.18B). Innerhalb des duplizierten Bereiches wurden keine Sequenzblöcke, sondern nur einzelne Basen rein statistisch ausgetauscht. Die beiden Transkripte entstehen also nicht etwa durch alternatives Spleißen eines gemeinsamen Primärtranskriptes, sondern haben auf DNA-Ebene wahrscheinlich einen gemeinsamen Vorfahren. Im Fall der E2-cDNA muß dieses Vorläufergen im Laufe der Evolution dupliziert worden sein.

Die ESP2-Sequenz ist sehr Cystein-reich und zeigt eine Homologie zu bakteriellen Ferredoxinen (vgl. Abb.19). ESP2 könnte ein eisenbindendes Protein sein, daß eine Funktion im Eisenmetabolismus erfüllt, oder es ist vielleicht ein Säugerpendant zu den eisenenthaltenden Ferredoxinen der Bakterien und Pflanzen. Im letzteren Fall wäre ESP2 am Elektronentransport der Zelle beteiligt und es wäre möglich, daß dieses Protein eine Rolle bei den bekannten physiologischen Effekten von 17 β -Estradiol auf den Energieverbrauch spielt [143, 144].

5. Zusammenfassung

cDNAs zweier estradiolstimulierbarer Transkripte, E1 und E2, wurden aus einer λ gt10-cDNA-Bibliothek isoliert und charakterisiert.

Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde poly(A⁺)-RNA aus estradiolbehandelten Ratten-C6 Glioma-Zellen isoliert und zur Synthese doppelsträngiger cDNA eingesetzt. Die erhaltene cDNA wurde mit Linkern versehen, gröbenselektioniert und in die EcoRI-Schnittstelle von λ gt10-DNA einkloniert. Um optimale Klonierungseffizienzen zu erreichen, wurde ein *in vitro*-Verpackungsextrakt hergestellt und zur Verpackung der rekombinierten DNA in infektiöse Phagenpartikel benutzt. Die erstellte λ gt10-cDNA-Bibliothek enthielt 700000 unabhängige Rekombinanten.

Mit Hilfe der Plasmidproben pE1 und pE2, die kurze, unvollständige cDNAs aus dem 3'-nichttranslatierten Bereich der estradiolstimulierbaren Transkripte E1 und E2 enthalten, wurden mehrere längere, homologe cDNAs aus der Phagenbank isoliert.

Durch die Sequenzierung des E1-cDNA-Klons 3e*, der ca. 2/3 der E1-Transkriptlänge repräsentiert, konnte das E1-Transkript als die mitochondrialcodierte Untereinheit I der Cytochrom C-Oxidase identifiziert werden.

Die durch Sequenzierungen der cDNAs ermittelte, vollständige E2-Transkriptlänge beträgt 1318nt. Die E2-cDNA-Sequenz enthält einen offenen Leserahmen, der für 164 Aminosäuren codiert. Das Initiationscodon liegt innerhalb einer Konsensussequenz für eine Ribosomenbindungsstelle. Am 3'-Ende der E2-cDNA-Sequenz, 17nt stromaufwärts der Polyadenylierungsstelle, befindet sich ein Polyadenylierungssignal.

In Northern-Analysen wurden Gewebespezifitäten für das E2-Transkript in männlichen und weiblichen Ratten untersucht. Die E2-mRNA wird in den Gehirnen beider Geschlechter gleich stark, in einer Reihe von Körpergeweben (Leber, Niere, Herz) allerdings sexuell dimorph exprimiert.

Eine mit dem Computer durchgeführte Homologiesuche in einer Proteindatenbank enthüllte eine Ähnlichkeit eines Teilbereichs der hypothetischen E2-Proteinsequenz mit dem CRIP-Protein [119], einem putativen Produkt der Ferredoxin-Genfamilie.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Williams, R.H., Hrsg. (1974)
in Textbook of Endocrinology
Saunders, Philadelphia
- [2] Jensen, E.V. (1987)
in Steroid Hormone Receptors S.13-25
Hrsg. C.R. Clark, Ellis Horwood, Chichester
- [3] Yamamoto, K.R. (1985)
Ann. Rev. Genet. 19, 209-252
- [4] Bailly, A., Atger, M., Atger, P., Cerbon, M.-A., Alizon, M.,
Hai, M.T.V., Logeat, F. & Milgrom, E. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 10384-10389
- [5] Klock, G., Strähle, U. & Schütz, G. (1987)
Nature 329, 734-736
- [6] Mulvihill, E.R., LePenneec, J.-P. & Chambon, P. (1982)
Cell 24, 621-632
- [7] Pongs, O. (1988)
Eur. J. Biochem. 175, 199-204
- [8] Renkawitz, R., Schütz, G., von der Ahe, D. &
Beato, M. (1984)
Cell 37, 503-510
- [9] Dean, D.C., Gope, R., Knoll, B.J., Riser, M.E. &
O'Malley, B.W. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 9967-9970
- [10] Gronemeyer, H. & Pongs, O. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2108-2112
- [11] Dworniczak, B., Seidel, R. & Pongs, O. (1983)
EMBO J. 2, 1323-1330
- [12] May, F.E.B., Ryffel, G.U., Weber, R. & Westley, B.R. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 19919-19923
- [13] Kumar, S., Weingarten, D.P., Callahan, J.W., Sachar, K. &
de Vellis, J. (1984)
J. Neurochem. 43, 1455-1463
- [14] Vannice, J.L., Taylor, J.M. & Ringold, G.M. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4241-4245
- [15] Brock, M.L. & Shapiro, D.J. (1983)
Cell 34, 207-214
- [16] Kazmeier, M., Brüning, E. & Ryffel, G.U. (1985)
EMBO J. 4, 1261-1266
- [17] Firestone, G.L., Payvar, F. & Yamamoto, K.R. (1982)
Nature 300, 221-225
- [18] Chambon, P., Dierich, A., Gaub, M.P., Jakowley, S.,
Jongstra, J., Krust, A., Lepenneec, J.P., Oudet, P. &
Reudelhuber, P. (1984)
Rec. Prog. Horm. Res. 40, 1-42
- [19] McEwen, B.S., Davis, P.G., Parsons, B. & Pfaff, D.W. (1979)
Ann. Rev. Neurosci. 2, 65-112
- [20] MacLusky, N.J. & Naftolin, F. (1981)
Science 211, 1294-1303
- [21] Beyer, C. & Feder, H.H. (1987)
Ann. Rev. Physiol. 49, 349-364
- [22] Arnold, A.P. & Gorski, R.A. (1984)
Ann. Rev. Neurosci. 7 413-442

- [23] MacLusky, N.J., Naftolin, F. & Goldman-Rakic, P.S. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 513-516
- [24] McEwen, B.S. (1981)
Science 211, 1303-1311
- [25] Rainbow, T.C., Parsons, B. & McEwen, B.S. (1983)
Nature 300, 648-649
- [26] Toran-Allerand, C.D. (1984)
Prog. Brain. Res. 61, 63-97
- [27] Gorski, R.A. (1985)
in Synaptic Plasticity S. 287-310
Hrsg. C.W. Cotman, Guilford, New York
- [28] Arnold, A.P. (1985)
in Synaptic Plasticity S. 263-285
Hrsg. C.W. Cotman, Guilford, New York
- [29] Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. & Sweet, W. (1968)
Science 161, 370-371
- [30] Pishak, M.R. & Phillips, A.T. (1980)
J. Neurochem. 34, 866-872
- [31] Yoshikawa, K. & Sabol, S.L. (1986)
Mol. Brain. Res. 1, 75-83
- [32] Elkouby, A., Ledig, M. & Mandel, P. (1982)
Neurochem. Res. 7, 387-397
- [33] Arenander, A.T. & de Vellis, J. (1980)
Brain. Res. 200, 401-419
- [34] Grasso, R.J. (1976)
Cancer Res. 36, 2408-2414
- [35] de Vellis, J. & English, D. (1972)
In vitro 7, 247
- [36] Siegrist, H.P., Burkart, T., Hoffmann, K., Wiesmann, U. & Herschkowitz, N. (1979)
Biochem. Biophys. Acta 572, 160-166
- [37] Perez-Polo, J.R., Hall, K., Livingston, K. & Westlund, K. (1977)
Life Sci. 21, 1535-1544
- [38] Vlahova, M. (1985)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- [39] Appleyard, R.K. (1954)
Genetics 39, 440-452
- [40] Young, R.A. & Davis, R.W. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194-1198
- [41] Yanish-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985)
Gene 33, 103-119
- [42] Messing, J., Crea, R. & Seeburg, P.H. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 309-321
- [43] Hohn, B. (1979)
Meth. Enzymol. 68, 299-309
- [44] Boyer, H. & Roulland-Dussoix, D. (1969)
J. Mol. Biol. 41, 459-472
- [45] Spizizen, J. (1958)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 1072-1078
- [46] Enquist, L. & Sternberg, N. (1979)
Meth. Enzymol. 68, 281-298
- [47] Huynh, T.V., Young, R.A. & Davis, R.W. (1985)
in DNA cloning: A practical Approach Vol I S. 49-78
Hrsg. D.M. Glover, IRL Press, Oxford

- [48] Watson, C.J. & Jackson, J.F. (1985)
in DNA cloning: A practical Approach Vol.I S. 79-88
Hrsg. D.M. Glover, IRL Press, Oxford
- [49] Okayama, H. & Berg, P. (1982)
Mol. Cell. Biol. 2, 161-170
- [50] Gubler, U. & Hoffmann, B.J. (1983)
Gene 25, 263-269
- [51] Maniatis, T., Fritsch, E.F.; Sambrook, J. (1982)
in Molecular Cloning: A Laboratory Manual,
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- [52] Benton, W.D. & Davis, R.W. (1977)
Science 196, 180-182
- [53] Bender, W., Spierer, P. & Hogness, D.S. (1983)
J. Mol. Biol. 168, 17-33
- [54] Grunstein, M. & Hogness, D.S. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965
- [55] Twigg, A.J. & Sherratt, D. (1980)
Nature 283, 216-218
- [56] Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-
Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.-A., Grunwald, D.J.,
Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L. &
Smithies, O. (1977)
Science 196, 161-169
- [57] Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R.,
Lawhorne, L. & Treiber, G. (1970)
Virology 40, 734-741
- [58] Baumann, A. (1986)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- [59] Tautz, D. & Renz, M. (1983)
Anal. Biochem. 132, 14-19
- [60] Heiermann, R. (1984)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- [61] Langridge, J., Langridge, P. & Bergquist, P.L. (1980)
Anal. Biochem. 103, 264-271
- [62] Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619
- [63] Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979)
Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523
- [64] Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1980)
Meth. Enzymol. 65, 499-560
- [65] Rigby, R.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977)
J. Mol. Biol. 113, 237-251
- [66] Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983)
Anal. Biochem. 136, 6-13
- [67] Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984)
Anal. Biochem. 137, 266-267
- [68] Vieira, J. & Messing, J. (1982)
Gene 19, 259-268
- [69] Mandel, M. & Higa, A. (1970)
J. Mol. Biol. 53, 154-163
- [70] Seidel, R.P. (1986)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- [71] Hanahan, D. (1985)
in DNA cloning: A practical Approach Vol.I S. 109-135
Hrsg. D.M. Glover, IRL Press, Oxford

- [72] Hanahan, D. (1983)
J. Mol. Biol. 166, 557-580
- [73] Messing, J. & Vieira, J. (1982)
Gene 19, 269-276
- [74] Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
- [75] Mizusawa, S., Nishimura, S. & Seela, F. (1986)
Nucl. Acids Res. 14, 1319-1324
- [76] Bailey, J.M. & Davidson, N. (1976)
Anal. Biochem. 70, 70-85
- [77] Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. & Boedtker, H. (1977)
Biochem. 16, 4743-4751
- [78] Goldberg, D.A. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5794-5798
- [79] Garoff, H. & Ansorge, W. (1981)
Anal. Biochem. 115, 450-457
- [80] Laskey, R.A. & Mills, A.D. (1975)
Eur. J. Biochem. 56, 335-341
- [81] Wahl, G.M., Stern, M. & Stark, G.R. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3683-3687
- [82] Meinkoth, J. & Wahl, G. (1984)
Anal. Biochem. 138, 267-284
- [83] Southern, E.M. (1975)
J. Mol. Biol. 98, 503-517
- [84] Denhardt, D.T. (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-652
- [85] Thomas, P.S. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205
- [86] Smith, G.E. & Summers, M.D. (1980)
Anal. Biochem. 109, 123-129
- [87] Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J.M., Pictet, R., Tischler, E.,
Rutter, W.J. & Goodman, H.M. (1977)
Science 196, 1313-1319
- [88] Glisin, V., Crkvenjakov, R. & Byus, C. (1974)
Biochem. 13, 2633-2637
- [89] Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. &
Rutter, W.J. (1979)
Biochem. 18, 5294-5299
- [90] Aviv, H. & Leder, P. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412
- [91] Efstratiadis, A. & Kafatos, F.C. (1976)
in Methods in Molecular Biology Vol. XVIII S. 1-124
Hrsg. J.A. Last, Marcel Dekker, New York
- [92] Blackburn, P. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 12484-12487
- [93] Queen, C. & Korn, L.J. (1984)
Nucl. Acids Res. 12, 581-599
- [94] Blackburn, P., Wilson, G. & Moore, S. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 5904-5910
- [95] Efstratiadis, A. & Villa-Komaroff, L. (1979)
in Genetic Engineering: Principles and Methods
Vol. I S. 15-36,
Hrsg. J.K. Setlow & A. Hollaender, Plenum Press, New York
- [96] LaPolla, R.J., Mayne, K.M. & Davidson, N. (1984)
Natl. Acad. Sci. USA 81, 7970-7974

- [97] Merlie, J.P., Hofler, J.G. & Sebbane, R. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 6995-6999
- [98] Efstratiadis, A., Kafatos, F.C., Maxam, A.M. &
Maniatis, T. (1976)
Cell 7, 279-288
- [99] Wickens, M.P., Buell, G.N. & Schimke, R.T. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 2483-2495
- [100] Gerard, G.F. (1983)
in Enzymes of Nucleic Acid Synthesis and Modification:
DNA Enzymes Vol. I S. 1-38
Hrsg. S.T. Jacob, CRC Press Inc., Boca Raton
- [101] Moelling, K. (1974)
Virol. 62, 46-59
- [102] Gerard, G.F. & Grandgenett, D.P. (1975)
J. Virol. 15, 785-797
- [103] Greene, P.J., Betlach, M.C., Boyer, H.W. &
Goodman, H.M. (1974)
in Methods in Molecular Biology Vol. VII S. 87-111
Hrsg. R.B. Wickner, Marcel Dekker, New York
- [104] Seeburg, P.H., Shine, J., Martial, J.A., Baxter, J.D. &
Goodman, H.M. (1977)
Nature 270, 486-494
- [105] Winnacker, E.-L., Hrsg. (1985)
in Gene und Klone: Eine Einführung in die Gentechnologie,
Verlag Chemie, Weinheim
- [106] Sealey, P.G. & Southern, E.M. (1983)
in Gel Elektrophoresis of Nucleic Acids:
A practical Approach S. 39-76
Hrsg. D. Rickwood & B.D. Hames, IRL Press, Oxford
- [107] Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F. &
Petersen, G.B. (1982)
J. Mol. Biol. 162, 729-773
- [108] Murray, N.E., Brammar, W.J. & Murray, K. (1977)
Mol. Gen. Genet. 150, 53-61
- [109] Attardi, G. (1985)
Int. Rev. Cytol. 93, 93-145
- [110] Cantatore, P. & Saccone, C. (1987)
Int. Rev. Cytol. 108, 149-208
- [111] Grosskopf, R. & Feldmann, H. (1981)
Curr. Gen. 4, 151-158
- [112] Capaldi, R.A., Takamiya, S., Zhang, Y.-Z., Gonzalez-
Halphen, D. & Yanamura, W. (1987)
Curr. Top. Bioenerg. 15, 91-112
- [113] Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W. &
Clayton, D.A. (1981)
Cell 26, 167-180
- [114] Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L.,
Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P.,
Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H.,
Staden, R. & Young, I.G. (1981)
Nature 290, 457-465
- [115] Saluz, H.P., Jiricny, J. & Jost, J.P. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7167-7171
- [116] Proudfoot, N. (1984)
Nature 302, 412-413

- [117] Kozak, M. (1983)
Microbiol. Rev. 47, 1-45
- [118] Kyte, J. & Doolittle, R.J. (1982)
J. Mol. Biol. 157, 105-132
- [119] Birkenmeyer, E.H. & Gordon, J.I. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2516-2520
- [120] Yasunobu, K.T. & Tanaka, M. (1973)
Syst. Zool. 22, 570-589
- [121] Sutcliffe, J.G. (1978)
Nucl. Acids Res. 5, 2721-2728
- [122] Silverman, S., Schmidt, O., Söll, D. & Hovemann, B. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 10290-10294
- [123] Szybalski, E.H. & Szybalski, W. (1979)
Gene 7, 217-270
- [124] Minter, S. & Sealey, P. (1983)
in Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach S. 227-232,
Hrsg. D. Rickwood & B.D. Hames, IRL Press, Oxford
- [125] Stewart, R.M. & Rosenberg, R.N. (1979)
Int. Rev. Neurobiol. 21, 275-309
- [126] Pfeiffer, S.E., Betschart, B., Cook, J., Mancini, P. & Morris, R. (1977)
in Cell, Tissue and Organ Cultures in Neurobiology
S. 287-346
Hrsg. S.A. Fedoroff & L. Hertz, Academic Press, New York
- [127] Stewart, P.A. & Coomber, B.L. (1986)
in Astrocytes Vol. I S. 311-328
Hrsg. S. Fedoroff & A. Vernadakis, Academic Press, Orlando
- [128] Berwald-Netter, Y., Koulakoff, A., Nowak, L. & Ascher, P. (1986)
in Astrocytes Vol. II S. 51-75
Hrsg. S. Fedoroff & A. Vernadakis, Academic Press, Orlando
- [129] Racik, P. (1981)
Trends Neurosci. 4, 184-187
- [130] Lander, J. & McCarthy, K. (1986)
in Astrocytes Vol. II S. 295-314
Hrsg. S. Fedoroff & A. Vernadakis, Academic Press, Orlando
- [131] Manthorpe, M., Rudge, J.S. & Varon, S. (1986)
in Astrocytes Vol. II S. 315-376
S. Fedoroff & A. Vernadakis, Academic Press, Orlando
- [132] Henn, F.A. & Hamberger, A. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2686-2690
- [133] Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P. & Norenberg, M.D. (1977)
Science 195, 1356-1358
- [134] Birnstiel, M.L., Busslinger, M. & Straub, R. (1985)
Cell 41, 349-359
- [135] Rosenberg, S.M., Stahl, M.M., Kobayashi, I & Stahl, F.W. (1985)
Gene 38, 165-175
- [136] Nelson, D. (1987)
Curr. Top. Bioenerg. 15, 221-272
- [137] Yu, F.L. & Feigelson, P. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 213, 134-141
- [138] Mansour, A.M. & Nass, S. (1970)
Nature 228, 665-667

- [139] Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P. & Richards, G. (1974)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 655-662
- [140] Kozak, M. (1984)
Nucl. Acids Res. 12, 857-872
- [141] Clayton, D. A. (1984)
Ann. Rev. Biochem. 53, 573-594
- [142] Lee, D. C., McKnight, G. S. & Palmiter, R. D. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 3494-3503
- [143] Bartness, T. J. & Wade, G. N. (1984)
Behav. Neurosci. 98, 674-685
- [144] Scheider, J. E., Palmer, L. A. & Wade, G. N. (1986)
Physiol. Behav. 38, 119-126
- [145] Henning, S. J. (1981)
Amer. J. Physiol. 241, G199-G241
- [146] Kuhn-Nentwig, L. & Kadenbach, B. (1985)
Eur. J. Biochem. 149, 147-158
- [147] Karlson, P. (1980)
in Progress in Ecdysson Research S. 1-9
Hrsg. J. A. Hoffmann, Elsevier, North-Holland

Lebenslauf

11.10.55 Hans Peter Nalik, geboren in Herne/Westf.

1962-1964 Besuch der Lutherschule in Wattenscheid

1964-1966 Besuch der Gemeinschaftsschule in
Bochum-Wiemelhausen

1966-1975 Besuch des neusprachlichen Zweigs des
Graf-Engelbert-Gymnasiums in Bochum

9.6.75 Abitur am Graf-Engelbert-Gymnasium

1975-1976 Grundwehrdienst in Coesfeld

1976-1983 Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum

Juni 1978
und
Juni 1980 Pflichtwehrübungen in Brüssel

1983-1984 Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Bio-
chemie der Fakultät für Chemie bei Prof. Dr. O. Pongs

30.5.84 Diplom-Hauptprüfung in Chemie

1984-1988 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehr-
stuhl für Biochemie der Ruhr-Universität Bochum
bei Prof. Dr. O. Pongs

Veröffentlichung:

Kanngießer, U., Nalik, P. & Pongs, O. (1988)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2969-2973

